



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

(11) BR 112013012630-2 B1



(22) Data do Depósito: 21/11/2011

(45) Data de Concessão: 08/09/2021

(54) Título: CÉLULA DE LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR 3-HP

(51) Int.Cl.: C12N 1/18; C12P 7/42; C12P 7/52.

(30) Prioridade Unionista: 15/09/2011 US 61/535,181; 22/11/2010 US 61/416,199.

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

(72) Inventor(es): DEBBIE YAYER; HOLLY JESSEN; BRIAN RUSH; JEANETTE HURYTA; BETH MASTEL; ALAN BERRY; MICHAEL CATLETT; MICHELLE BARNHARDT.

(86) Pedido PCT: PCT US2011061717 de 21/11/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/074818 de 07/06/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/05/2013

(57) Resumo: CÉLULA DE LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR 3-HP. O presente pedido descreve células de levedura geneticamente modificadas que compreendem uma via de fermentação de 3-HP ativa, e o uso destas células para produzir 3-HP.

“CÉLULA DE LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA, E, MÉTODO PARA PRODUIR 3-HP”

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[001] Este pedido contém uma listagem de sequência na forma legível por computador, que é aqui incorporada por referência.

FUNDAMENTOS

[002] O ácido 3-hidroxi propiônico (3-HP) é um ácido carboxílico de três carbonos identificado pelo U.S. Department of Energy como um dos 12 produtos químicos de bloco de construção potencial alto de topo que podem ser fabricados pela fermentação. Os nomes alternativos para 3-HP, que é um isômero de ácido láctico (2-hidroxi propiônico), incluem ácido etileno láctico e 3-hidroxi propionato. 3-HP é um produto químico de plataforma renovável atraente, com 100% de rendimento teórico a partir da glicose, grupos funcionais múltiplos que permitem que o mesmo participe em uma variedade de reações químicas, e baixa toxicidade. 3-HP pode ser usado como um substrato para formar vários produtos químicos de consumo, tais como 1,3-propanodiol, ácido malônico, acrilamida, e ácido acrílico. O ácido acrílico é um produto químico de grande volume > 3 milhões de toneladas/ano (7 bilhões libras/ano) usado para fabricar ésteres de acrilato e polímeros superabsorventes, e é correntemente derivado da oxidação catalítica de propileno. Produção fermentativa de 3-HP forneceria uma alternativa sustentável para os produtos petroquímicos como a matéria prima para estes produtos químicos comercialmente significantes, reduzindo assim o consumo de energia, a dependência dos Estados Unidos do óleo estrangeiro, e a produção de gases de estufa.

[003] As bactérias podem ser usadas para fermentar açúcares para ácidos orgânicos. Entretanto, as bactérias apresentam certas desvantagens para a produção de ácido orgânico em larga escala. Conforme os ácidos orgânicos são produzidos, o meio de fermentação torna-se crescentemente

ácido. As condições de pH mais baixas são de fato preferíveis, porque o produto resultante está parcial ou totalmente na forma de ácido. Entretanto, a maioria das bactérias que produzem ácidos orgânicos não desempenha bem em ambientes fortemente ácidos, e, portanto morrem ou começam a produzir tão lentamente que se tornam economicamente inviável conforme o meio se torna mais ácido. Para prevenir isto, torna-se necessário tamponar o meio para manter um pH mais alto. Entretanto, isto torna a recuperação do produto ácido orgânico mais difícil e caro.

[004] Tem havido interesse crescente nos anos recentes em torno do uso de levedura para fermentar açúcares para ácidos orgânicos. As leveduras são usadas como biocatalisadores em várias fermentações industriais, e apresentam várias vantagens em relação às bactérias. Embora muitas bactérias sejam incapazes de sintetizar certos aminoácidos ou proteínas que elas necessitam para crescer e metabolizar açúcares eficientemente, a maioria das espécies de levedura podem sintetizar seus aminoácidos ou proteínas necessários a partir de compostos de nitrogênio inorgânicos. As leveduras também não são suscetíveis à infecção por bacteriófago, que pode levar à perda de produtividade ou de rodadas de fermentação inteiras em bactérias.

[005] Embora as leveduras sejam candidatos atraentes para a produção de ácido orgânico, elas apresentam várias dificuldades. Primeiro, o engendramento do caminho na levedura é tipicamente mais difícil do que em bactérias. As enzimas na levedura são compartimentalizadas no citoplasma, mitocôndria, ou peroxissomas, ao passo que nas bactérias elas estão reunidas no citoplasma. Isto significa que os sinais de alvejamento podem necessitar ser removidos para garantir que todas as enzimas do caminho biossintético coexistam no mesmo compartimento dentro de uma única célula. O controle de transporte dos intermediários do caminho entre os compartimentos também pode ser necessário para maximizar o fluxo de

carbono para o produto desejado. Em segundo lugar, nem todas as espécies de levedura atingem os critérios necessários para a fermentação econômica em uma escala grande. De fato, apenas uma pequena porcentagem de leveduras possui a combinação de utilização de açúcar volumétrica e específica suficientemente alta com a capacidade para crescer robustamente sob condições de pH baixo. O U.S. Department of Energy tem estimado que as taxas de produção de aproximadamente 2,5 g/L/hora são necessárias para as fermentações econômicas de vários ácidos orgânicos, incluindo 3-HP (<http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>).

[006] Embora muitas espécies de levedura naturalmente fermentem açúcares de hexose para etanol, poucos, se algum, produzem naturalmente rendimentos significantes de ácidos orgânicos. Isto tem levado a esforços para modificar geneticamente várias espécies de levedura para produzir ácidos orgânicos. Cepas de levedura geneticamente modificadas que produzem ácido láctico foram anteriormente desenvolvidas pelo rompimento ou deleção do gene de piruvato descarboxilase nativa (PDC) e inserindo um gene de lactato desidrogenase (LDH) para eliminar a produção de etanol (ver, por exemplo, a WO99/14335, WO00/71738, WO02/42471, WO03/049525, WO03/102152 e WO03/102201). Esta alteração desvia o metabolismo de açúcar a partir da produção de etanol para a produção de ácido láctico. Os produtos e caminhos da fermentação para levedura diferem daqueles das bactérias, e assim métodos de engendramento diferentes são necessários para maximizar o rendimento. Outros produtos nativos que podem requerer a eliminação ou redução de modo a realçar o rendimento ou pureza do produto de ácido orgânico são glicerol, acetato, e dióis. A redução de glicerol em cepas de levedura geneticamente alteradas é descrita, por exemplo, na WO07/106524.

[007] Diferente do ácido láctico, o 3-HP não é um produto final principal de qualquer caminho conhecido na natureza, sendo encontrado

apenas em quantidades traço em algumas bactérias e fungos. Assim, muito do engendramento genético é necessário para gerar levedura que produz 3-HP. Uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* foi previamente engendrada para produzir 3-HP em níveis muito baixos através de um intermediário de lactato (ver a WO02/042418). Entretanto, o nível de tolerância de *S. cerevisiae* do tipo selvagem é insuficiente para fabricar um hospedeiro ótimo para a produção de 3-HP. Portanto, existe uma necessidade quanto a cepas de levedura melhoradas que geram 3-HP em uma maneira mais econômica em uma escala industrial.

SUMÁRIO

[008] Em certas formas de realização são aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de PEP, piruvato, e/ou glicerol para 3-HP. Em certas formas de realização, as células aqui fornecidas contêm um ou mais genes do caminho de 3-HP que codifica as enzimas com atividade de PPC, PYC, AAT, ADC, BAAT, gabT, 3-HPDH, HIBADH, 4-hidroxibutirato desidrogenase, ACC, AAM, alanina desidrogenase, aldeído desidrogenase, BCKA, KGD, 4-aminobutirato aminotransferase, β -alanil-CoA amônia liase, malonato semialdeído desidrogenase que acila Co-A, CoA sintetase, CoA transferase, glicerol desidratase, IPDA, LDH, lactil-CoA desidratase, malato descarboxilase, malato desidrogenase, malonil-CoA redutase, OAA formiatoliase, OAA desidrogenase, piruvato/alanina aminotransferase, PDH, 2-ceto ácido descarboxilase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-CoA hidrolase, ou 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase.

[009] Em certas formas de realização são aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de PEP ou piruvato para 3-HP, em que as células contêm um ou mais genes que codificam as enzimas com atividade de PPC, PYC, AAT, ADC, BAAT, gabT, 3-HPDH, HIBADH, e 4-

hidroxibutirato desidrogenase. Em certas formas de realização, um ou mais dos genes do caminho de 3-HP são exógenos, e nestas formas de realização os genes podem ser derivados de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera. Por exemplo, as células podem conter um gene de PYC de levedura derivado de *I. orientalis* ou um gene de PYC bacteriano derivado de *R. sphaeroides*, *R. etli*, *P. fluorescens*, *C. glutamicum*, ou *S. meliloti*; um gene de PPC bacteriano derivado da *E. coli*, *M. thermoautotrophicum*, ou *C. perfringens*, um gene de AAT de levedura derivado da *I. orientalis* ou *S. cerevisiae* ou um gene de AAT bacteriano derivado da *E. coli*; um gene de ADC bacteriano derivado da *S. avermitilis*, *C. acetobutyllicum*, *H. pylori*, *B. licheniformis*, ou *C. glutamicum*; um gene de BAAT de levedura derivado da *I. orientalis* ou *S. kluyveri* ou um gene de BAAT bacteriano derivado da *S. avermitilis*; um gene de gabT de levedura derivado da *S. cerevisiae* ou um gene de gabT bacteriano derivado da *S. avermitilis*; um gene de 3-HPDH de levedura derivado da *I. orientalis* ou *S. cerevisiae* ou um gene de 3-HPDH bacteriano derivado da *E. coli* ou *M. sedula*; um gene de HIBADH bacteriano derivado da *A. faecalis*, *P. putida*, ou *P. aeruginosa*; e/ou um gene de 4-hidroxibutirato desidrogenase de levedura derivado da *C. kluyveri* ou um gene de 4-hidroxibutirato desidrogenase bacteriana derivado da *R. eutropha*.

[010] Em certas formas de realização são aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de PEP ou piruvato para 3-HP, em que as células contêm um ou mais genes que codificam as enzimas com atividade de PPC, malato desidrogenase, e malato descarboxilase. Em certas formas de realização, um ou mais dos genes do caminho de 3-HP são exógenos, e nestas formas de realização os genes podem ser derivados de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera.

[011] Em certas formas de realização são aqui fornecidas

células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de PEP ou piruvato para 3-HP, em que as células contêm um ou mais genes que codificam as enzimas com atividade de PPC, 2-ceto ácido descarboxilase, KGD, BCKA, indolpiruvato descarboxilase, 3-HPDH, HIBADH, ou 4-hidroxibutirato desidrogenase. Em certas formas de realização, um ou mais dos genes do caminho de 3-HP são exógenos, e nestas formas de realização os genes podem ser derivados de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera.

[012] Em certas formas de realização são aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de PEP ou piruvato para 3-HP, em que as células contêm um ou mais genes que codificam as enzimas com atividade de PPC, OAA formiatoliase, malonil-CoA redutase, malonato semialdeído desidrogenase que acila Co-A, 3-HPDH, HIBADH, e 4-hidroxibutirato desidrogenase. Em certas formas de realização, um ou mais dos genes do caminho de 3-HP são exógenos, e nestas formas de realização os genes podem ser derivados de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera.

[013] Em certas formas de realização são aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de piruvato para 3-HP, em que as células contêm um ou mais genes que codificam as enzimas com atividade de PDH, acetil-CoA carboxilase, malonil-CoA redutase, malonato semialdeído desidrogenase que acila CoA, 3-HPDH, HIBADH, e 4-hidroxibutirato desidrogenase. Em certas formas de realização, um ou mais dos genes do caminho de 3-HP são exógenos, e nestas formas de realização os genes podem ser derivados de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera.

[014] Em certas formas de realização são aqui fornecidas

células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de piruvato para 3-HP, em que as células contêm um ou mais genes que codificam as enzimas com atividade de alanina desidrogenase, piruvato/alanina aminotransferase, alanina 2,3 aminomutase, CoA transferase, CoA sintetase, β -alanil-CoA amônia liase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-CoA hidrolase, 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, BAAT, 3-HPDH, HIBADH, e 4-hidroxibutirato desidrogenase. Em certas formas de realização, um ou mais dos genes do caminho de 3-HP são exógenos, e nestas formas de realização os genes podem ser derivados de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera.

[015] Em certas formas de realização são aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de piruvato para 3-HP, em que as células contêm um ou mais genes que codificam as enzimas com atividade de LDH, CoA transferase, lactil-CoA desidratase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-CoA hidrolase, e 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase. Em certas formas de realização, um ou mais dos genes do caminho de 3-HP são exógenos, e nestas formas de realização os genes podem ser derivados de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera.

[016] Em certas formas de realização são aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas que compreendem um caminho de fermentação de 3-HP ativo de PEP ou piruvato para 3-HP, em que as células contêm um ou mais genes que codificam as enzimas com atividade de glicerol desidratase e aldeído desidrogenase. Em certas formas de realização, um ou mais dos genes do caminho de 3-HP são exógenos, e nestas formas de realização os genes podem ser derivados de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera.

[017] As células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas podem ser qualquer espécie de levedura. Em certas formas de

realização, as células são negativas em Crabtree, e em certas destas formas de realização elas pertencem aos gêneros *Issatchenkia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, ou *Saccharomyces*. Em certas destas formas de realização, as células podem pertencer ao clado *I. orientalis*/*P. fermentans* ou o clado *Saccharomyces*, e nestas formas de realização elas podem ser *I. orientalis*, *C. lambica*, ou *S. bulderi*. Em certas formas de realização, as células de levedura podem ser células de levedura resistentes a 3-HP. A resistência a 3-HP pode ser um traço nativo das células ou a mesma resulta das células que sofreram mutação e/ou seleção antes, durante, ou depois da introdução de modificações genéticas relacionadas com um caminho de fermentação de 3-HP ativo, ou uma combinação destas. Em certas formas de realização, as células de levedura podem exibir um grau de tolerância aos ácidos orgânicos diferentes de 3-HP, outros produtos de fermentação ou subprodutos, e/ou vários componentes do meio que seja maior do que aquele exibido pelas células de levedura do tipo selvagem da mesma espécie. Em certas formas de realização, as células de levedura têm sofrido mutação e/ou seleção, tal que as células mutadas e/ou selecionadas possuam um grau mais alto de resistência para 3-HP do que uma célula do tipo selvagem da mesma espécie. Em algumas destas formas de realização, a célula sofreu mutação e/ou seleção antes de ser geneticamente modificada com o um ou mais genes exógenos do caminho de 3-HP. Em algumas formas de realização, a célula sofreu seleção na presença de ácido láctico ou 3-HP. Em algumas formas de realização, a seleção é seleção de quimiostato.

[018] Além das modificações relacionadas com um caminho de fermentação de 3-HP ativo, as células aqui fornecidas podem conter deleções ou interrupções de um ou mais genes nativos. Por exemplo, as células podem conter deleções ou interrupções de um ou mais genes de PDC, ADH, GAL6, CYB2A, CYB2B, GPD, GPP, ALD, ou PCK. Em certas formas de realização, estas deleções ou interrupções podem estar ligadas à introdução

de um ou mais genes relacionados com um caminho de fermentação de 3-HP ativo.

[019] Em certas formas de realização são aqui fornecidos métodos de produzir 3-HP usando as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas pelo cultivo das células na presença de pelo menos uma fonte de carbono e isolando 3-HP do meio de cultura. Em certas destas formas de realização, a fonte de carbono pode ser selecionada de um ou mais de glicose, xilose, arabinose, sacarose, frutose, celulose, glicose oligômeros, e glicerol.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

[020] Figura 1: Resumo de caminhos de fermentação de 3-HP selecionados

[021] Figura 2: Plasmídeo pMIBa107

[022] Figura 3-: Representação esquemática de uma técnica de integração alvejada

[023] Figura 4: Plasmídeo pGMEr125(um)

[024] Figura 5: Plasmídeo pGMRr125(b)

[025] Figura 6: Plasmídeo pGMEr121

[026] Figura 7: Plasmídeo pMhCt074

[027] Figura 8: Plasmídeo pMhCt083

[028] Figura 9: Plasmídeo pMhCt087

[029] Figura 10: Plasmídeo pMhCt075

[030] Figura 11: Plasmídeo pMhCt077

[031] Figura 12: Plasmídeo pMhCt095

[032] Figura 13: Plasmídeo pMhCt096

[033] Figura 14: Plasmídeo pMeJi310-2

[034] Figura 15: Plasmídeo pMeJi312-2

[035] Figura 16: Plasmídeo pGMEr126

[036] Figura 17: Plasmídeo pGMEr130

- [037] Figura 18: Plasmídeo pGMEr137
- [038] Figura 19: Plasmídeo pACN5
- [039] Figura 20: Plasmídeo pACN23
- [040] Figura 21: Plasmídeo pHJJ27
- [041] Figura 22: Plasmídeo pACN43
- [042] Figura 23: Plasmídeo pHJJ75
- [043] Figura 24: Plasmídeo pHJJ76
- [044] Figura 25: Plasmídeo pJLJ49
- [045] Figura 26: Plasmídeo pJLJ62
- [046] Figura 27: Plasmídeo pMI458
- [047] Figura 28: Plasmídeo pCM208
- [048] Figura 29: Plasmídeo pJY39
- [049] Figura 3-0: Plasmídeo pMcTs64
- [050] Figura 3-1: Plasmídeo pMcTs65
- [051] Figura 3-2: Plasmídeo pJLJ8.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[052] A descrição que segue da invenção é meramente intencionada a ilustrar várias formas de realização da invenção. Como tal, as modificações específicas debatidas não devem ser interpretadas como limitações no escopo da invenção. Estará evidente a uma pessoa habilitada na técnica que vários equivalentes, mudanças, e modificações podem ser feitas sem divergir do escopo da invenção, e é entendido que tais formas de realização equivalentes devem ser aqui incluídas.

[053] Todas as referências aqui citadas são incorporadas por referência em sua totalidade.

Abreviações

[054] 3-HP, ácido 3-hidroxipropiônico; 3-HPA, 3-hidroxipropionaldeído; 3-HPDH, ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase; AAM, alanina 2,3 aminomutase; AAT, aspartato aminotransferase; ACC,

acetil-CoA carboxilase; ADC, aspartato 1-descarboxilase; AKG, alfa-cetoglutarato; ALD, aldeído desidrogenase; BAAT, β -alanina aminotransferase; BCKA, alfa-ceto ácido descarboxilase de cadeia ramificada; bp, pares de base; CYB2, L-(+)-lactato-citocromo c oxidorreductase; CYC, iso-2-citocromo c; EMS, etano metil sulfonase; ENO, enolase; gabT, 4-aminobutirato aminotransferase; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3; GPD, glicerol 3-fosfato desidrogenase; GPP, glicerol 3-fosfato fosfatase; HIBADH, 3-hidroxiisobutirato desidrogenase; IPDA, indolpiruvato descarboxilase; KGD, alfa-cetoglutarato descarboxilase; LDH, lactato desidrogenase; MAE, enzima málica; OAA, oxaloacetato; PCK, fosfoenolpiruvato carboxicinase; PDC, piruvato descarboxilase; PDH, piruvato desidrogenase; PEP, fosfoenolpiruvato; PGK, fosfoglicerato cinase; PPC, fosfoenolpiruvato carboxilase; PYC, piruvato carboxilase; RKI, ribose 5-fosfato cetol-isomerase; TAL, transaldolase; TEF1, fator 1 de alongamento de tradução; TEF2, fator 2 de alongamento de tradução; TKL, transcetolase, XDH, xilitol desidrogenase; XR, xilose redutase, YP, extrato de levedura/peptona.

Descrição

[055] São aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas para a produção de 3-HP, métodos de fabricar estas células de levedura, e métodos de usar estas células para produzir 3-HP. “3-HP” como aqui usado inclui as formas salinas e ácidas do ácido 3-hidroxipropiônico.

[056] Vários caminhos da fermentação de 3-HP são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, a Patente US No. 6.852.517; Patente US No. 7.309.597; Pub. US No. 2001/0021978; Pub. US No. 2008/0199926; WO02/42418; e WO10/031083, todas aqui incorporadas por referência). Os caminhos de fermentação 3-HP operam por intermédio de uma série de intermediários que podem incluir fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato, oxaloacetato (OAA), aspartato, β -alanina, malonato semialdeído, malato,

malonil-CoA, acetil-CoA, alanina, lactato, lactil-CoA, acrilil-CoA, glicerol, 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA), β -alanil-CoA, 3-HP-CoA, e glicerato. Uma revisão de vários dos caminhos de fermentação de 3-HP conhecidos é apresentada na Figura 1.

[057] Como aqui divulgado um conjunto de células de levedura de várias espécies foram testadas quanto à resistência a 3-HP. As células que exibem resistência a 3-HP foram avaliadas ainda com base nas suas taxas de crescimento e taxas de consumo de glicose em meios contendo concentrações variáveis de 3-HP. Com base nestes experimentos, um conjunto de células hospedeiras ideais para a produção de 3-HP foi identificado. Estas células hospedeiras foram depois geneticamente modificadas para conter um caminho de fermentação de 3-HP ativo, resultando nas células de levedura geneticamente modificadas que produzem 3-HP sob condições de pH baixas.

[058] Em certas formas de realização são aqui fornecidas células de levedura geneticamente modificadas tendo pelo menos um caminho de fermentação de 3-HP ativo de PEP, piruvato, e/ou glicerol para 3-HP. Uma célula de levedura tendo um “caminho de fermentação de 3-HP ativo” como aqui usada produz enzimas ativas necessárias para catalisar cada reação em um caminho de fermentação de 3-HP, e, portanto, é capaz de produzir 3-HP em rendimentos mensuráveis quando cultivada sob condições de fermentação na presença de pelo menos um açúcar fermentáveis. Uma célula de levedura tendo um caminho de fermentação de 3-HP ativo compreende um ou mais genes do caminho de 3-HP. Um “gene do caminho de 3-HP” como aqui usado refere-se à região codificadora de uma sequência de nucleotídeo que codifica uma enzima envolvida em um caminho de fermentação de 3-HP.

[059] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários PEP ou piruvato, OAA, aspartato, β -

alanina, e malonato semialdeído (ver, por exemplo, Pub. US No. 2010/0021978, Figura 1). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto do caminho de fermentação de genes 3-HP que compreende um ou mais dos genes de piruvato carboxilase (PYC), PEP carboxilase (PPC), aspartato aminotransferase (AAT), aspartato 1-descarboxilase (ADC), β -alanina aminotransferase (BAAT), aminobutirato aminotransferase (gabT), 3-HP desidrogenase (3-HPDH), 3-hidroxiisobutirato desidrogenase (HIBADH), e 4-hidroxibutirato desidrogenase. O caminho de fermentação de genes 3-HP também pode incluir um gene de PEP carboxicinase (PCK) que foi modificado para produzir um polipeptídeo que preferivelmente catalisa a conversão de PEP para OAA (genes PCK nativos no geral produzem um polipeptídeo que preferivelmente catalisa a reação reversa de OAA para PEP).

[060] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários de PEP ou piruvato, OAA, e malato (ver, por exemplo, a Pub. US No. 2010/0021978, Figura 4). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto de genes do conjunto de caminho de fermentação de 3-HP que compreendem um ou mais dos genes de PPC, PYC, malato desidrogenase, e malato descarboxilase. Os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP também podem incluir um gene de PCK que foi modificado para produzir um polipeptídeo que preferivelmente catalisa a conversão de PEP para OAA.

[061] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários PEP ou piruvato, OAA, e malonato semialdeído (ver, por exemplo, Pub. US No. 2010/0021978, Figura 1). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto de genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP que compreendem um

ou mais dos genes de PPC, PYC, 2-ceto ácido descarboxilase, alfa-cetoglutarato (AKG) descarboxilase (KGD), alfa-ceto ácido descarboxilase de cadeia ramificada (BCKA), indolpiruvato descarboxilase (IPDA), 3-HPDH, HIBADH, e 4-hidroxi butirato desidrogenase. Os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP também podem incluir um gene de PCK que foi modificado para produzir um polipeptídeo que preferivelmente catalisa a conversão de PEP para OAA. Além disso, os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP podem incluir um gene de PDC e/ou gene de benzoilformiato descarboxilase que foi modificada para codificar um polipeptídeo capaz de catalisar a conversão de OAA para a malonato semialdeído.

[062] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários PEP ou piruvato, OAA, malonil-CoA, e malonato semialdeído, em que o intermediário de malonato semialdeído é opcional (ver, por exemplo, a Pub. US No. 2010/0021978, Figura 2). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto de genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP que compreende um ou mais de PPC, PYC, OAA formiatolise, malonil-CoA redutase, malonato semialdeído desidrogenase que acila os genes da CoA, 3-HPDH, HIBADH, e 4-hidroxi butirato desidrogenase. Os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP também podem incluir um gene de PCK que foi modificado para produzir um polipeptídeo que preferivelmente catalisa a conversão de PEP para OAA. Além disso, os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP podem incluir um gene de OAA desidrogenase derivado pela modificação de um gene de 2-ceto-ácido desidrogenase para produzir um polipeptídeo que catalisa a conversão de OAA para malonil-CoA.

[063] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários de piruvato, acetil-CoA, malonil-CoA, e

malonato semialdeído, em que o intermediário da malonato semialdeído é opcional (ver, por exemplo, WO02/042418, Figura 44). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto de genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP que compreendem um ou mais dos genes de piruvato desidrogenase (PDH), acetil-CoA carboxilase (ACC), malonil-CoA redutase, malonato semialdeído desidrogenase que acila CoA, 3-HPDH, HIBADH, e 4-hidroxibutirato desidrogenase.

[064] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários de piruvato, alanina, β -alanina, β -alanil-CoA, acrilil-CoA, 3-HP-CoA, e malonato semialdeído, em que os intermediários β -alanil-CoA, acrilil-CoA, 3-HP-CoA, e malonato semialdeído são opcionais (β -alanina pode ser convertido para 3-HP por intermédio de um intermediário de malonato semialdeído ou por intermédio de β -alanil-CoA, acrilil-CoA, e 3-HP-CoA intermediários (ver, por exemplo, a Patente a US 7.309.597, Figura 1). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto de genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP que compreendem um ou mais dos genes de alanina desidrogenase, piruvato/alanina aminotransferase, alanina 2,3 aminomutase, CoA transferase, CoA sintetase, β -alanil-CoA amônia liase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-CoA hidrolase, 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, BAAT, 3-HPDH, HIBADH, e 4-hidroxibutirato desidrogenase.

[065] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários de piruvato, lactato, lactil-CoA, acrilil-CoA, e 3-HP-CoA (ver, por exemplo, WO02/042418, Figura 1). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto de genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP que compreendem um ou mais dos genes de LDH, CoA transferase, CoA sintetase, lactil-CoA desidratase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-

CoA hidrolase, e 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase.

[066] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários de glicerol e 3-HPA (ver, por exemplo, a Patente US 6.852.517). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto de genes do conjunto do caminho da fermentação de 3-HP que compreende um ou mais dos genes da glicerol desidratase e aldeído desidrogenase.

[067] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas têm um caminho de fermentação de 3-HP ativo que prossegue através dos intermediários PEP ou piruvato, OAA, aspartato, β -alanina, β -alanil-CoA, acrilil-CoA, 3-HP-CoA, e alanina, em que os intermediários OAA, aspartato, e alanina são opcionais (PEP ou piruvato podem ser convertidos para β -alanina por intermédio de OAA e aspartato ou por intermédio de alanina) (ver a WO02/042418, Figura 54; Patente US 7.309.597, Figura 1). Nestas formas de realização, as células de levedura compreendem um conjunto de genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP que compreendem um ou mais dos genes de PPC, PYC, AAT, ADC, CoA transferase, CoA sintetase, β -alanil-CoA amônia liase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-CoA hidrolase, 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, alanina desidrogenase, piruvato/alanina aminotransferase, e AAM. Os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP também podem incluir um gene de PCK que foi modificado para produzir um polipeptídeo que preferivelmente catalisa a conversão de PEP para OAA.

[068] Os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP nas células de levedura aqui fornecidas podem ser endógenos ou exógenos. “Endógeno” como aqui usado com respeito aos componentes genéticos tais como genes, promotores, e sequências terminadoras significa que o componente genético está presente em um local particular no genoma

de uma forma nativa de uma célula de levedura particular. “Exógeno” como aqui usado com respeito aos componentes genéticos significa que o componente genético não está presente em um local particular no genoma de uma forma nativa de uma célula de levedura particular. “Nativo” como aqui usado com respeito a uma célula de levedura refere-se a uma célula de levedura do tipo selvagem de uma espécie de levedura particular. “Nativo” como aqui usado com respeito a um caminho metabólico refere-se a um caminho metabólico que existe e é ativo em uma célula de levedura nativa.

[069] Um componente genético exógeno pode ter uma sequência nativa ou não nativa. Um componente genético exógeno com uma sequência nativa compreende uma sequência idêntica a (com exceção das mutações de indivíduo para indivíduo que não afetam a função) um componente genético que está presente no genoma de uma célula nativa (isto é, o componente genético exógeno é idêntico a um componente genético endógeno). Entretanto, os componentes exógenos estão presentes em um local diferente no genoma da célula hospedeira do que o componente endógeno. Por exemplo, um gene de *PYC* exógeno que é idêntico a um gene de *PYC* endógeno pode ser inserido em uma célula de levedura, resultando em uma célula modificada com um número não nativo (aumentado) de cópias de gene de *PYC*. Um componente genético exógeno com uma sequência não nativa compreende uma sequência que não é encontrada no genoma de uma célula nativa. Por exemplo, um gene de *PYC* exógeno de uma espécie particular pode ser inserido dentro de uma célula de levedura de outra espécie. Um gene exógeno é preferivelmente integrado no genoma da célula hospedeira em uma maneira funcional, significando que o mesmo é capaz de produzir uma proteína ativa na célula hospedeira. Entretanto, em certas formas de realização o gene exógeno pode ser introduzido na célula como parte de um vetor que é estavelmente mantido no citoplasma do hospedeiro.

[070] Em certas formas de realização, as células de

levedura aqui fornecidas compreendem um ou mais gene exógenos do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP. Em certas formas de realização, as células de levedura geneticamente modificadas aqui divulgadas compreendem um gene exógeno único. Em outras formas de realização, as células de levedura compreendem genes exógenos múltiplos. Nestas formas de realização, as células de levedura podem compreender cópias múltiplas de um gene exógeno único e/ou cópias de dois ou mais genes exógenos diferentes. As células de levedura que compreendem genes exógenos múltiplos podem compreender qualquer número de genes exógenos. Por exemplo, estas células de levedura podem compreender de 1 a 20 genes exógenos, e em certas formas de realização preferidas elas podem compreender de 1 a 7 genes exógenos. As cópias múltiplas de um gene exógeno podem ser integradas em um único local tal que elas estejam adjacentes uma à outra. Alternativamente, elas podem ser integradas em vários locais dentro do genoma da célula hospedeira.

[071] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas compreendem um ou mais genes endógenos do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP. Em certas destas formas de realização, as células podem ser engendradas para superexpressar um ou mais destes genes endógenos, significando que as células modificadas expressam o gene endógeno em um nível mais alto do que uma célula nativa sob pelo menos algumas condições. Em certas destas formas de realização, o gene endógeno que é superexpresso pode estar operativamente ligado a um ou mais elementos reguladores exógenos. Por exemplo, um ou mais promotores fortes exógenos nativos ou não nativos pode ser introduzido dentro de uma célula tal que elas sejam operativamente ligadas a um ou mais genes endógenos do caminho de 3-HP.

[072] Os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP nas células modificadas de levedura aqui fornecidas podem ser

operativamente ligados a um ou mais elementos reguladores tais como um promotor ou terminador. Como aqui usado, o termo “promotor” refere-se a uma sequência não traduzida localizada a montante (isto é, 5’) em relação ao códon de início de tradução de um gene (no geral dentro de cerca de 1 a 1000 pares de base (bp), preferivelmente dentro de cerca de 1 a 500 pares de base) que controla o início de transcrição do gene. O termo “terminador” como aqui usado refere-se a uma sequência não traduzida localizada a jusante (isto é, 3’) em relação ao códon de término de tradução de um gene (no geral dentro de cerca de 1 a 1000 pares de base, preferivelmente dentro de cerca de 1 a 500 pares de base, e especialmente dentro de cerca de 1 a 100 pares de base) que controla o final de transcrição do gene. Um promotor ou terminador é “operativamente ligado” a um gene se a sua posição no genoma em relação a aquele do gene é tal que o promotor ou terminador, como o case pode ser realiza a sua função de controle transcricional. Os promotores e terminadores adequados são descritos, por exemplo, na WO99/14335, WO00/71738, WO02/42471, WO03/102201, WO03/102152 e WO03/049525 (todas aqui incorporadas por referência em sua totalidade).

[073] Os elementos reguladores ligados aos genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP nas células aqui fornecidas podem ser endógenos ou exógenos. Por exemplo, um caminho de fermentação exógeno do gene de 3-HP pode ser inserido em uma célula de levedura tal que o mesmo esteja sob o controle transcricional de um promotor e/ou terminador endógenos. Alternativamente, o caminho de fermentação exógeno do gene de 3-HP pode ser ligado a um ou mais elementos reguladores exógenos. Por exemplo, um gene exógeno pode ser introduzido na célula como parte de uma construção de expressão de gene que compreende um ou mais elementos reguladores exógenos. Em certas formas de realização, elementos reguladores exógenos, ou pelo menos as porções funcionais de elementos reguladores exógenos, podem compreender sequências nativas. Em outras formas de

realização, elementos reguladores exógenos podem compreender sequências não nativas. Nestas formas de realização, os elementos reguladores exógenos podem compreender uma sequência com um grau relativamente alto de identidade de sequência com um elemento regulador nativo. Por exemplo, um gene exógeno pode ser ligado a um promotor ou terminador exógenos tendo pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com um promotor ou terminador nativos. As porcentagens de identidade de sequência para as sequências de nucleotídeo ou aminoácido podem ser calculadas pelos métodos conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, usando o software BLAST (National Center for Biological Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool) versão 2.2.1 com parâmetros de default. Por exemplo, uma sequência tendo uma contagem de identidade de pelo menos 90%, usando o algoritmo BLAST versão 2.2.1 com parâmetros de default é considerado ter pelo menos 90% de identidade de sequência. O software BLAST é disponível da NCBI, Bethesda, Maryland.

[074] Em certos aspectos, um elemento regulador (por exemplo, um promotor) ligado a um caminho de fermentação do gene de 3-HP nas células aqui fornecidas pode ser estranho para o gene do caminho. Um elemento regulador que é estranho para um gene do caminho é um elemento regulador que não é ligado ao gene na sua forma natural. O técnico habilitado pode avaliar que um elemento regulador estranho a um gene do caminho pode ser endógeno ou exógeno, dependendo do gene do caminho e a sua relação com a célula de levedura. Em alguns casos, um caminho de fermentação do gene de 3-HP endógeno é operativamente ligado a um elemento regulador (por exemplo, um promotor) que é estranho ao gene do caminho. Em outros casos, um caminho de fermentação do gene de 3-HP exógeno é operativamente ligado a um elemento regulador exógeno (por exemplo, um promotor) que é estranho ao gene do caminho.

[075] Nestas formas de realização em que os genes exógenos múltiplos são inseridos em uma célula hospedeira, cada gene exógeno pode estar sob o controle de um elemento regulador diferente, ou dois ou mais genes exógenos podem estar sob o controle dos mesmos elementos reguladores. Por exemplo, onde um primeiro gene exógeno é ligado a um primeiro elemento regulador, um segundo gene exógeno também pode ser ligado ao primeiro elemento regulador, ou pode ser ligado a um segundo elemento regulador. O primeiro e o segundo elementos reguladores podem ser idênticos ou compartilhar um alto grau de identidade de sequência, ou ser totalmente não relacionado.

[076] Os exemplos de promotores que podem ser ligados a um ou mais genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP nas células de levedura aqui fornecidas incluem, mas não são limitados a, promotores para os genes de PDC1, fosfoglicerato cinase (PGK), xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH), L-(+)-lactato-citocromo c oxidorreductase (CYB2), fator 1 de alongamento de tradução (TEF1), fator 2 de alongamento de tradução (TEF2), enolase (ENO1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), e orotidina 5'-fosfato descarboxilase (URA3). Nestes exemplos, os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP podem estar ligados aos promotores endógenos ou exógenos para os genes de PDC1, PGK, XDH, CYB2, TEF1, TEF2, ENO1, GAPDH, ou URA3. Onde os promotores são exógenos, eles podem ser idênticos a ou compartilhar um alto grau de identidade de sequência (isto é, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 99%) com promotores nativos para genes de PDC1, PGK, XR, XDH, CYB2, TEF1, TEF2, ENO1, GAPDH, ou URA3.

[077] Os exemplos de terminadores que podem ser ligados a um ou mais genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP nas células de levedura aqui fornecidas incluem, mas não são limitados a,

terminadores para os genes de PDC1, XR, XDH, transaldolase (TAL), transcetolase (TKL), ribose 5-fosfato cetol-isomerase (RKI), CYB2, ou iso-2-citocromo c (CYC) ou a família de galactose de genes (especialmente o terminador GAL10). Nestes exemplos, os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP podem estar ligados aos terminadores endógenos ou exógenos para os genes de PDC1, XR, XDH, TAL, TKL, RKI, CYB2, ou CYC ou os genes da família da galactose. Onde os terminadores são exógenos, eles podem ser idênticos a ou compartilhar um alto grau de identidade de sequência (isto é, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 99%) com terminadores nativos para os genes de PDC1, XR, XDH, TAL, TKL, RKI, CYB2, ou CYC ou genes da família da galactose. Em certas formas de realização, os genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP são ligados a um terminador que compreende uma porção funcional de um gene GAL10 nativo para a célula hospedeira ou uma sequência que compartilha pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% identidade de sequência com um terminador GAL10 nativo.

[078] Os genes exógenos podem ser inseridos em uma célula hospedeira de levedura por intermédio de qualquer método conhecido na técnica. Em formas de realização preferidas, os genes são integrados no genoma da célula hospedeira. Os genes exógenos podem ser integrados no genoma em uma maneira alvejada ou uma aleatória. Nestas formas de realização onde o gene é integrado em uma maneira alvejada, o mesmo pode ser integrado nos locais para um gene de Particular, tal que a integração do gene exógeno seja emparelhado para a deleção ou rompimento de um gene nativo. Por exemplo, a introdução de um gene exógeno do caminho de 3-HP pode ser emparelhada para a deleção ou rompimento de um ou mais genes que codificam as enzimas envolvidas em outros caminhos de produto de fermentação. Alternativamente, o gene exógeno pode ser integrado em uma

porção do genoma que não corresponde a um gene.

[079] A integração e/ou deleção alvejadas podem utilizar uma construção de integração. O termo “construção”, como aqui usado, refere-se a uma sequência de DNA que é usada para transformar uma célula hospedeira. A construção pode ser, por exemplo, um plasmídeo ou vetor circular, uma porção de um plasmídeo ou vetor circular (tal como um produto de digestão de enzima de digestão), um plasmídeo ou vetor linearizado, ou um produto de PCR preparado usando um plasmídeo ou DNA genômico como um padrão. Métodos para a transformação de uma célula de levedura com uma construção exógena são descritos, por exemplo, na WO99/14335, WO00/71738, WO02/42471, WO03/102201, WO03/102152, e WO03/049525. Uma construção de integração pode ser montada usando duas sequências de DNA alvejadas clonadas de um alvo de sítio de inserção. As duas sequências de DNA alvejadas podem ser contíguas ou não contíguas no genoma hospedeiro nativo. Neste contexto, “não contíguo” significa que as sequências de DNA não são imediatamente adjacentes uma à outra no genoma nativo, mas ao invés são separados por uma região que deva ser deletada. Sequências “contíguas” como aqui usadas são diretamente adjacentes à outra no genoma nativo. Onde a integração alvejada deve ser emparelhada para deleção ou rompimento de um gene de Alvo, a construção de integração também pode ser aludida como uma construção de deleção. Em uma construção de deleção, uma das sequências alvo pode incluir uma região 5’ em relação ao promotor do gene de Alvo, toda ou uma porção da região promotora, toda ou uma porção da sequência que codifica o gene de Alvo, ou alguma de suas combinações. A outra sequência alvo pode incluir uma região 3’ em relação ao terminador do gene de Alvo, toda ou uma porção da região terminadora, e/ou toda ou uma porção da sequência codificadora do gene de Alvo. Onde a integração alvejada não deva ser emparelhada para deleção ou rompimento de um gene nativo, as sequências alvos são selecionadas tal que a inserção de uma sequência interveniente não romperá a expressão de gene nativo. Uma construção de

integração ou deleção é preparada tal que as duas sequências alvos são orientadas na mesma direção em relação uma à outra como elas nativamente aparecem no genoma da célula hospedeira. Onde uma construção de integração ou deleção é usada para introduzir um gene exógeno dentro de uma célula hospedeira, um cassete de expressão de gene é clonado na construção entre as duas sequências de gene de Alvo para permitir a expressão do gene exógeno. O cassete de expressão de gene contém o gene exógeno, e pode incluir ainda uma ou mais sequências reguladoras tais como promotores ou terminadores operativamente ligadas ao gene exógeno. As construções de deleção também podem ser construídas de modo que não contenham um cassete de expressão de gene. Tais construções são designadas para deletar ou romper uma sequência de gene sem a inserção de um gene exógeno.

[080] Uma construção de integração ou deleção pode compreender um ou mais cassetes de marcador de seleção clonados na construção entre as duas sequências de gene de Alvo. O cassete marcador de seleção contém pelo menos um gene marcador de seleção que permite a seleção de transformantes. Um “gene marcador de seleção” é um gene que codifica uma proteína necessária para a sobrevivência e/ou crescimento da célula transformada em um meio de cultura seletivo, e, portanto, pode ser usado para aplicar pressão de seleção à célula. Os transformantes bem sucedidos conterão o gene marcador de seleção, que comunica à célula transformada com êxito pelo menos uma característica que fornece uma base para seleção. Os marcadores de seleção de gene típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência aos antibióticos ou outras toxinas (por exemplo, resistência à bleomicina ou zeomicina (por exemplo, gene de ble de *Streptoalloteichus hindustanus*), aminoglicosídeos tais como G418 ou canamicina (por exemplo, gene de resistência à canamicina de transposon Tn903), ou higromicina (por exemplo, gene de resistência ao antibiótico de aminoglicosídeo da *E. coli*)), (b) deficiências auxotróficas de complemento da

célula (por exemplo, deficiências em leucina (por exemplo, gene *LEU2* de *K. marxianus*), uracila (por exemplo, gene *URA3* de *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, ou *I. orientalis*), ou triptofano (por exemplo, gene *TRP* de *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, ou *I. orientalis*)), (c) capacita a célula para sintetizar nutrientes críticos não disponíveis a partir dos meios simples, ou (d) confere a capacidade para a célula crescer em uma fonte de carbono particular (por exemplo, gene *MEL5* de *S. cerevisiae*, que codifica a enzima de alfa-galactosidase (melibiase) e confere a capacidade para crescer em melibiose como a única fonte de carbono). Os marcadores de seleção preferidos incluem o gene *URA3*, gene de resistência à zeocina, gene de resistência à G418, gene *MEL5*, e gene de resistência à higromicina. Outro marcador de seleção preferido é um cassete de gene de L-lactato:ferricitocromo c oxidorreductase (*CYB2*), contanto que a célula hospedeira nativamente carece de um tal gene ou que o(s) seu(s) gene(s) *CYB2* nativo(s) são primeiro deletado(s) ou rompido(s). Um gene marcador de seleção é operativamente ligado a uma ou mais sequências promotoras e/ou terminadoras que são operáveis na célula hospedeira. Em certas formas de realização, estas sequências promotoras e/ou terminadoras são sequências promotoras e/ou terminadoras exógenas que são incluídas no cassete marcador de seleção. Os promotores e terminadores adequados são como aqui descritos.

[081] Uma construção de integração ou deleção é usada para transformar a célula hospedeira. A transformação pode ser realizada usando, por exemplo, métodos de eletroporação e/ou transformação química (por exemplo, com base em cloreto de cálcio, acetato de lítio, etc.). A seleção ou triagem com base na presença ou ausência do marcador de seleção podem ser realizadas para identificar transformantes bem sucedidos. Nos transformantes bem sucedidos, eventos de recombinação homóloga no local do sítio alvo resultam no rompimento ou na deleção da sequência do sítio alvo. Onde a construção alveja um gene nativo para a deleção ou rompimento,

toda ou uma porção do gene nativo alvo, seu promotor, e/ou seu terminador podem ser deletados durante este evento de recombinação. O cassete de expressão, cassete marcador de seleção, e qualquer outro material genético entre as sequências alvos na construção de integração são inseridos dentro do genoma hospedeiro no local que corresponde às sequências alvos. A análise pela PCR ou análise de Southern pode ser realizada para confirmar que as inserção/deleção desejadas ocorreram.

[082] Em algumas formas de realização, a transformação de célula pode ser realizada usando DNA de duas ou mais construções, produtos de PCR, ou uma combinação destes, ao invés de uma única construção ou produto de PCR. Nestas formas de realização, a extremidade 3' de um fragmento de integração se sobrepõe com a extremidade 5' de um outro fragmento de integração. Em um exemplo, uma construção conterá a primeira sequência do local da sequência alvo e uma parte não funcional do cassete de gene marcador, enquanto que a outra conterá a segunda sequência do local da sequência alvo e uma segunda parte não funcional do cassete de gene marcador. As partes do cassete de gene marcador são selecionadas tal que elas possam ser combinadas para formar um cassete completo. A célula é transformada com estes pedaços simultaneamente, resultando na formação de um marcador completo, funcional ou cassete de gene estrutural. Os transformantes bem sucedidos podem ser selecionados com base na característica comunicada pelo marcador de seleção. Em outro exemplo, o marcador de seleção reside em um fragmento, mas as sequências alvos estão em fragmentos separados, de modo que os fragmentos de integração têm uma alta probabilidade de integrar no site de interesse. Em outras formas de realização, a transformação de três DNAs lineares pode ser usada para integrar material exógeno. Nestas formas de realização, um fragmento se sobrepõe na extremidade 5' com um segundo fragmento e na extremidade 3' com um terceiro fragmento.

[083] Uma construção de integração ou deleção pode ser designada tal que o gene marcador de seleção e alguns ou todos destes elementos reguladores pode tornar-se espontaneamente deletados como um resultado de um evento de recombinação homóloga subsequente. Um modo conveniente de realizar isto é planejar a construção tal que o gene marcador de seleção e/ou elementos reguladores sejam flanqueados pelas sequências de repetição. As sequências de repetição são sequências de DNA idênticas, nativas ou não nativas para a célula hospedeira, e orientada na construção na mesma ou direção oposta com respeito a uma à outra. As sequências de repetição são vantajosamente de cerca de 50 a 1500 pares de base no comprimento, e não têm que codificar nada. A inclusão das sequências de repetição permite que um evento de recombinação homóloga ocorra, que resulta na deleção do gene marcador de seleção e uma das sequências de repetição. Visto que a recombinação homóloga ocorre com frequência relativamente baixa, pode ser necessário cultivar transformantes para várias rodadas nos meios não seletivos para permitir que a recombinação homóloga espontânea ocorra em algumas das células. As células nas quais o gene marcador de seleção tornou-se espontaneamente deletado podem ser selecionadas ou triadas com base na sua perda da característica de seleção comunicada pelo gene marcador de seleção. Em certos casos, a expressão de uma enzima de recombinase pode realçar a recombinação entre os sítios repetidos.

[084] Um caminho de fermentação exógeno do gene de 3-HP nas células de levedura modificadas aqui fornecidas pode ser derivado de um gene fonte de qualquer fonte adequada. Por exemplo, um gene exógeno pode ser derivado de uma fonte de levedura, fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera. Como aqui usado um gene exógeno que é “derivado de” um gene fonte nativo codifica um polipeptídeo que 1) é idêntico a um polipeptídeo codificado pelo gene nativo, 2) compartilha pelo menos 50%,

pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com um polipeptídeo codificado pelo gene nativo, e/ou 3) tem a mesma função em um caminho de fermentação de 3-HP como o polipeptídeo codificado pelo gene nativo. Por exemplo, um gene de PYC que é derivado de um gene de PYC de *I. orientalis* pode codificar um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2, um polipeptídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2, e/ou um polipeptídeo que tem a capacidade para catalisar a conversão de piruvato para OAA. Um gene derivado de um gene nativo pode compreender uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a região codificadora do gene nativo. Em certas formas de realização, um gene derivado de um gene nativo pode compreender uma sequência de nucleotídeo que é idêntica à região codificadora do gene fonte. Por exemplo, um gene de PYC que é derivado de um gene de PYC de *I. orientalis* pode compreender a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1.

[085] Em certas formas de realização das células modificadas de levedura aqui fornecidas, o gene fonte nativo a partir do qual o gene do caminho de fermentação de 3-HP exógeno é derivado produz um polipeptídeo que está envolvido em um caminho de fermentação de 3-HP. Em outras formas de realização, entretanto, o gene fonte nativo pode codificar um

polipeptídeo que não está envolvido em um caminho de fermentação de 3-HP ou que catalisa uma reação reversa em um caminho de fermentação de 3-HP. Nestas formas de realização, o gene exógeno do caminho de 3-HP sofrerá uma ou mais mutações alvejadas ou aleatórias versus o gene fonte nativo que resulta na atividade modificada e/ou preferência de substrato. Por exemplo, um gene fonte nativo pode ser mutado para gerar um gene que codifica um polipeptídeo com atividade aumentada em uma direção de reação desejada e/ou atividade diminuída em uma direção não desejada em um caminho de fermentação de 3-HP. Por exemplo, onde o gene fonte nativo codifica um polipeptídeo capaz de catalisar tanto uma reação para frente quanto uma para trás em um caminho de fermentação de 3-HP, o gene pode ser modificado tal que o gene exógeno resultante tenha atividade aumentada na direção avançada e atividade diminuída na direção reversa. Similarmente, um gene fonte nativo pode ser mutado para produzir um gene que codifica um polipeptídeo com preferência de substrato diferente do que o polipeptídeo nativo. Por exemplo, um gene do caminho de 3-HP pode ser mutado para produzir um polipeptídeo com a capacidade para atuar em um substrato que é não preferido ou não influenciado de nenhuma maneira pelo polipeptídeo nativo. Nestas formas de realização, o polipeptídeo codificado pelo gene exógeno do caminho de 3-HP pode catalisar uma reação que o polipeptídeo codificado pelo gene fonte nativo é completamente incapaz de catalisar. Um gene fonte nativo também pode ser mutado tal que o gene do caminho de 3-HP resultante exibe a inibição da retroalimentação diminuída no DNA, RNA, ou nível de proteína na presença de um ou mais intermediários do caminho de 3-HP a jusante ou produtos colaterais.

[086] Em certas formas de realização das células modificadas de levedura aqui fornecida um gene exógeno do caminho de 3-HP pode ser derivado das espécies de levedura hospedeiras. Por exemplo, onde a célula hospedeira é *I. orientalis*, um gene exógeno pode ser derivado

de um gene *I. orientalis*. Nestas formas de realização, o gene exógeno pode compreender uma sequência de nucleotídeo idêntica à região codificadora do gene nativo, tal que a incorporação do gene exógeno dentro da célula hospedeira aumenta o número de cópia de uma sequência de gene nativo e/ou mudanças no nível de regulação ou expressão do gene se sob o controle de um promotor que é diferente do promotor que dirige a expressão do gene em uma célula do tipo selvagem. Em outras formas de realização, o gene exógeno do caminho de 3-HP pode compreender uma sequência de nucleotídeo que difere da região codificadora de um gene do caminho de 3-HP nativo, mas não obstante codifica um polipeptídeo que é idêntico ao polipeptídeo codificado pelo gene do caminho de 3-HP nativo. Ainda em outras formas de realização, o gene exógeno do caminho de 3-HP pode compreender uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com um polipeptídeo codificado por um ou mais genes nativos do caminho de 3-HP. Em certas destas formas de realização, o gene exógeno compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com um ou mais genes nativos. Ainda em outras formas de realização, o gene de 3-HP exógeno pode codificar um polipeptídeo que tem menos do que 50% de identidade de sequência com um polipeptídeo codificado por um gene nativo do caminho de 3-HP, mas que não obstante tem a mesma função como o polipeptídeo nativo em um caminho de fermentação de 3-HP (isto é, a capacidade para catalisar a mesma reação). Um gene fonte nativo pode ser submetido à mutagênese se necessário para fornecer uma sequência codificadora partindo com o códon de partida eucariótico usual (ATG), ou para outros propósitos.

[087] Em outras formas de realização, o gene exógeno do caminho de 3-HP pode ser derivado de uma espécie que é diferente do que aquela da célula de levedura hospedeira. Em certas destas formas de realização, o gene exógeno do caminho de 3-HP pode ser derivado de uma espécie de levedura diferente do que a célula hospedeira. Por exemplo, onde a célula hospedeira é *I. orientalis*, o gene exógeno pode ser derivado da *S. cerevisiae*. Em outras formas de realização, o gene exógeno do caminho de 3-HP pode ser derivado de uma fonte fúngica, bacteriana, de planta, inseto, ou mamífera. Por exemplo, onde a célula hospedeira é *I. orientalis*, o gene exógeno pode ser derivado de uma fonte bacteriana tal como *E. coli*. Nestas formas de realização onde o gene exógeno do caminho de 3-HP é derivado de uma fonte que não levedura, a sequência de gene exógeno pode ser otimizada no códon para a expressão em uma célula hospedeira de levedura.

[088] Nestas formas de realização onde o gene exógeno do caminho de 3-HP é derivado de uma espécie outra que não a espécie de célula hospedeira, o gene exógeno pode codificar um polipeptídeo idêntico a um polipeptídeo codificado por um gene nativo do caminho de 3-HP do organismo fonte. Em certas destas formas de realização, o gene exógeno do caminho de 3-HP pode ser idêntico a um gene nativo do caminho de 3-HP do organismo fonte. Em outras formas de realização, o gene exógeno pode compartilhar pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com um gene nativo do caminho de 3-HP do organismo fonte. Em outras formas de realização, o gene exógeno do caminho de 3-HP pode codificar um polipeptídeo que compartilhe pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com um polipeptídeo codificado por um gene nativo do caminho de 3-HP do organismo fonte. Em certas destas

formas de realização, o gene exógeno pode compreender uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com um ou mais genes nativos do caminho de 3-HP do organismo fonte. Ainda em outras formas de realização, o gene de 3-HP exógeno pode codificar um polipeptídeo que tem menos do que 50% de identidade de sequência com um polipeptídeo codificado por um gene nativo do caminho de 3-HP do organismo fonte, mas que não obstante tem a mesma função como o polipeptídeo nativo do organismo fonte em um caminho de fermentação de 3-HP.

[089] Em certas formas de realização, as células de levedura aqui fornecidas expressam um ou mais genes do caminho de 3-HP que codificam as enzimas selecionadas do grupo que consiste de ACC (catalisa a conversão de acetil-CoA para malonil-CoA), alanina 2,3 aminomutase (AAM, catalisa a conversão de alanina para β -alanina), alanina desidrogenase (catalisa a conversão de piruvato para alanina), aldeído desidrogenase (catalisa a conversão de 3-HPA para 3-HP), KGD (catalisa a conversão de OAA para a malonato semialdeído), AAT (catalisa a conversão de OAA para aspartato), ADC (catalisa a conversão de aspartato para β -alanina), BCKA (catalisa a conversão de OAA para a malonato semialdeído), BAAT (catalisa a conversão de β -alanina para a malonato semialdeído), 4-aminobutirato aminotransferase (gabT, catalisa a conversão de β -alanina para a malonato semialdeído), β -alanil-CoA amônia liase (catalisa a conversão de β -alanil-CoA para acrilil-CoA), malonato semialdeído desidrogenase que acila Co-A (catalisa a conversão de malonil-CoA para malonato semialdeído), CoA sintetase (catalisa a conversão de β -alanina para β -alanil-CoA ou a conversão de lactato para lactil-CoA), CoA transferase (catalisa a conversão de β -alanina para β -alanil-CoA e/ou a conversão de lactato para lactil-CoA), glicerol desidratase (catalisa a conversão de glicerol para 3-HPA), IPDA

(catalisa a conversão de OAA para malonato semialdeído), LDH (catalisa a conversão de piruvato para lactato), lactil-CoA desidratase (catalisa a conversão de lactil-CoA para acrilil-CoA), malato descarboxilase (catalisa a conversão de malato para 3-HP), malato desidrogenase (catalisa a conversão de OAA para malato), malonil-CoA redutase (catalisa a conversão de malonil-CoA para malonato semialdeído ou 3-HP), OAA formiatoliase (também conhecido como piruvato-formiato liase e cetoácido formiato-liase, catalisa a conversão de OAA para malonil-CoA), OAA desidrogenase (catalisa a conversão de OAA para malonil CoA); PPC (catalisa a conversão de PEP para OAA), piruvato/alanina aminotransferase (catalisa a conversão de piruvato para alanina), PYC (catalisa a conversão de piruvato para OAA), PDH (catalisa a conversão de piruvato para acetil-CoA), 2-ceto ácido descarboxilase (catalisa a conversão de OAA para malonato semialdeído), 3-HP-CoA desidratase (também conhecido como acrilil-CoA hidratase, catalisa a conversão de acrilil-CoA para 3-HP-CoA), 3-HPDH (catalisa a conversão de malonato semialdeído para 3-HP), 3-HP-CoA hidrolase (catalisa a conversão de 3-HP-CoA para 3-HP), HIBADH (catalisa a conversão de malonato semialdeído para 3-HP), 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase (catalisa a conversão de 3-HP-CoA para 3-HP), e 4-hidroxibutirato desidrogenase (catalisa a conversão de malonato semialdeído para 3-HP). Para cada uma destas atividades de enzima, a reação de interesse em parênteses pode ser um resultado da atividade nativa ou não nativa.

[090] Um “gene de piruvato carboxilase” ou “gene de PYC” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com a atividade de piruvato carboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de piruvato, CO₂, e ATP para OAA, ADP, e fosfato. Em certas formas de realização, um gene de PYC pode ser derivado de uma levedura fonte. Por exemplo, o gene de PYC pode ser derivado de um gene de PYC de *I. orientalis* que codifica a sequência de

aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 2. Em outras formas de realização, o gene pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2. Em certas formas de realização, um gene de PYC derivado de *I. orientalis* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 1. Em outras formas de realização, o gene de PYC pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, o gene de PYC pode ser derivado de uma das poucas espécies bacterianas que usam apenas PYC e não PPC (ver abaixo) para a anaplerose, tal como *R. sphaeroides*, ou de uma espécie bacteriana que possui tanto PYC quanto PPC, tal como *R. etli*. As sequências de aminoácido codificadas pelos genes PYC de *R. sphaeroides* e *R. etli* são apresentadas nas SEQ ID NOs: 3 e 4, respectivamente. Um gene de PYC pode ser derivado de um gene que codifica a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 3 ou 4, ou de um gene que codifica uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 3 ou 4. Alternativamente, o gene de PYC pode ser derivado de um gene de PYC que codifica uma enzima que não tem uma dependência da acetil-CoA para a ativação, tal como um gene de PYC de *P. fluorescens* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 5 (subunidade de carboxitransferase) ou SEQ ID NO: 6 (subunidade da biotina carboxilase), um gene de PYC de *C. glutamicum* que codifica a sequência de aminoácido

apresentada na SEQ ID NO: 7, ou um gene que codifica uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 5, 6 ou 7. Um gene de PYC também pode ser derivado de um gene de PYC que codifica uma enzima que não é inibida pelo aspartato, tal como um gene de PYC de *S. meliloti* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 8 (Sauer FEMS Microbiol Rev 29: 765 (2005), ou de um gene que codifica uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8.

[091] Um “gene de PEP carboxilase” ou “gene de PPC” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de PEP carboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de PEP e CO₂ para OAA e fosfato. Em certas formas de realização, um gene de PPC pode ser derivado de um gene de PPC bacteriano. Por exemplo, o gene de PPC pode ser derivado de um gene de PPC da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 10 ou uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 10. Em certas formas de realização, um gene de PPC derivado da *E. coli* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 9 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo

apresentada na SEQ ID NO: 9. Em outras formas de realização, um gene de PPC pode ser derivado de um PPC tipo “A”, encontrado em muitas *archaea* e um número limitado de bactérias, que não é ativada pela acetil CoA e é menos inibida pelo aspartato. Por exemplo, um gene de PPC pode ser derivado de um gene de PPC A de *M. thermoautotrophicum* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 11, um gene de PPC A de *C. perfringens* que codificam a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12, ou um gene que codifica uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 11 ou 12. Em certas destas formas de realização, o gene pode ter sofrido uma ou mais mutações versus o gene nativo de modo a gerar uma enzima com características melhoradas. Por exemplo, o gene pode ter sido mutado para codificar um polipeptídeo PPC com resistência aumentada para a retroalimentação de aspartato versus o polipeptídeo nativo. Em outras formas de realização, o gene de PPC pode ser derivado de uma fonte vegetal.

[092] Um “gene de aspartato aminotransferase” ou “gene de AAT” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de aspartato aminotransferase, significando a capacidade para catalisar a conversão de OAA para aspartato. As enzimas tendo atividade de aspartato aminotransferase são classificadas como EC 2.6.1.1. Em certas formas de realização, um gene de AAT pode ser derivado de uma fonte de levedura tal como *I. orientalis* ou *S. cerevisiae*. Por exemplo, o gene de AAT pode ser derivado de um gene de AAT de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 14 ou um gene de AAT2 da *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 15. Em outras formas de realização, o gene pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos

60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 14 ou 15. Em certas formas de realização, um gene de AAT derivado de *I. orientalis* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 13 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 13. Em outras formas de realização, o gene de AAT pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, o gene de AAT pode ser derivado de um gene de AspC da *E. coli* que codifica um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras formas de realização, o gene pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 16.

[093] Um “gene de aspartato descarboxilase” ou “gene de ADC” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de aspartato descarboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de aspartato para β -alanina. As enzimas tendo atividade de aspartato descarboxilase são classificadas como EC 4.1.1.11. Em certas formas de realização, um gene de ADC pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Porque uma aspartato descarboxilase ativa pode requerer o processamento proteolítico de uma proenzima inativa, nestas formas de realização a célula hospedeira de levedura deve ser selecionada para suportar a formação de uma enzima ativa codificada por um gene de ADC bacteriano.

[094] Em algumas formas de realização, o gene de ADC

pode ser derivado de um gene de PanD *S. avermitilis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 17. Em algumas formas de realização, o gene de ADC pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 17. Em certas formas de realização, um gene de ADC derivado de *S. avermitilis* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 130, 145, 146, ou 147; ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 130, 145, 146, ou 147.

[095] Em outras formas de realização, o gene de ADC pode ser derivado de um gene de PanD de *C. acetobutlicum* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 18. Em algumas formas de realização, o gene de ADC pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 18. Em certas formas de realização, um gene de ADC derivado de *C. acetobutlicum* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 131, ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 131.

[096] Em outras formas de realização, o gene de ADC

pode ser derivado de um gene de ADC de *H. pylori* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 133. Em algumas formas de realização, o gene de ADC pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 133. Em certas formas de realização, um gene de ADC derivado de *H. pylori* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 133, ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 133.

[097] Em outras formas de realização, o gene de ADC pode ser derivado de um gene de ADC TS25 de *Bacillus sp.* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 135. Em algumas formas de realização, o gene de ADC pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 135. Em certas formas de realização, um gene de ADC derivado de TS25 de *Bacillus sp.* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 134, ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 134.

[098] Em outras formas de realização, o gene de ADC pode ser derivado de um gene de ADC de *C. glutamicum* que codifica a

sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 137. Em algumas formas de realização, o gene de ADC pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 137. Em certas formas de realização, um gene de ADC derivado de *C. glutamicum* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 136, ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 136.

[099] Em outras formas de realização, o gene de ADC pode ser derivado de um gene de ADC de *B. licheniformis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 139. Em algumas formas de realização, o gene de ADC pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 139. Em certas formas de realização, um gene de ADC derivado de *B. licheniformis* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 138, 148, 149, 150, ou 151; ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 138, 148, 149, 150, ou 151.

[0100] Um “gene de β -alanina aminotransferase” ou “gene de BAAT” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um

polipeptídeo com atividade de β -alanina aminotransferase, significando a capacidade para catalisar a conversão de β -alanina para a malonato semialdeído. As enzimas tendo atividade de β -alanina aminotransferase são classificadas como EC 2.6.1.19. Em certas formas de realização, um gene de BAAT pode ser derivado de uma fonte de levedura. Por exemplo, um gene de BAAT pode ser derivado do homólogo de *I. orientalis* para o gene de Pyd4 que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 20. Em algumas formas de realização, o gene de BAAT pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 20. Em certas formas de realização, um gene de BAAT derivado de *I. orientalis* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 19 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 19. Em outras formas de realização, o gene de BAAT pode ser derivado do gene de Pyd4 de *S. kluyveri* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 21. Em algumas formas de realização, o gene de BAAT pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21. Em certas formas de realização, um gene de BAAT derivado de *S. kluyveri* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 142 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos

99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 142. Em outras formas de realização, o gene de BAAT pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de BAAT pode ser derivado de um gene de BAAT de *S. avermitilis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 22. Em algumas formas de realização, o gene de BAAT pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 22. Em certas formas de realização, um gene de BAAT derivado de *S. avermitilis* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 140 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 140.

[0101] Um gene de BAAT também pode ser uma “4-aminobutirato aminotransferase” ou “gene de gabT” significando que o mesmo tem atividade nativa em 4-aminobutirato assim como β -alanina. Alternativamente, um gene de BAAT pode ser derivado pelo engendramento aleatório ou direcionado de um gene de gabT nativo de uma fonte bacteriana ou de levedura para codificar um polipeptídeo com atividade de BAAT. Por exemplo, um gene de BAAT pode ser derivado da sequência de aminoácido que codifica gabT de *S. avermitilis* apresentada na SEQ ID NO: 23. Em algumas formas de realização, o gene de BAAT derivado de *S. avermitilis* pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 23. Em outras

formas de realização, um gene de BAAT pode ser derivado do gene de gabT de *S. cerevisiae* UGA1 que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 24. Em algumas formas de realização, o gene de BAAT derivado de *S. cerevisiae* pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24. Em certas formas de realização, um gene de BAAT derivado de *S. cerevisiae* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 141 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 141.

[0102] Um “gene de 3-HP desidrogenase” ou “gene de 3-HPDH” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de 3-HP desidrogenase, significando a capacidade para catalisar a conversão de malonato semialdeído para 3-HP. As enzimas tendo atividade da 3-HP desidrogenase são classificadas como EC 1.1.1.59 se elas utilizam um cofator NAD(H), e como EC 1.1.1.298 se elas utilizam um cofator NADP(H). As enzimas classificadas como EC 1.1.1.298 são alternativamente aludidas como malonato semialdeído redutases.

[0103] Em certas formas de realização, um gene de 3-HPDH pode ser derivado de uma fonte de levedura. Por exemplo, um gene de 3-HPDH pode ser derivado do homólogo da *I. orientalis* para o gene YMR226C que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 26. Em algumas formas de realização, o gene de 3-HPDH pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos

95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 26. Em certas formas de realização, um gene de 3-HPDH derivado de *I. orientalis* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 25 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 25. Em outras formas de realização, um gene de 3-HPDH pode ser derivado do gene YMR226C da *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 129. Em algumas formas de realização, o gene de 3-HPDH pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 129. Em certas formas de realização, um gene de 3-HPDH derivado da *S. cerevisiae* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 144 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 144.

[0104] Em outras formas de realização, o gene de 3-HPDH pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de 3-HPDH pode ser derivado de um gene ydfG da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido na SEQ ID NO: 27. Em algumas formas de realização, o gene pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 27. Em certas

formas de realização, um gene de 3-HPDH derivado da *E. coli* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 143 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 143. Em outras formas de realização, um gene de 3-HPDH pode ser derivado de um gene de malonato semialdeído redutase de *M. sedula* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 29. Em algumas formas de realização, o gene de 3-HPDH pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 29. Em certas formas de realização, um gene de 3-HPDH derivado de *M. sedula* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 343 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 343.

[0105] Um “gene de 3-hidroxiisobutirato desidrogenase” ou “gene de HIBADH” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de 3-hidroxiisobutirato desidrogenase, significando a capacidade para catalisar a conversão de 3-hidroxiisobutirato para metilmalonato semialdeído. As enzimas tendo a atividade de 3-hidroxiisobutirato desidrogenase são classificadas como EC 1.1.1.31. Algumas 3-hidroxiisobutirato desidrogenases também têm atividade de 3-HPDH. Em certas formas de realização, um gene de HIBADH pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de HIBADH pode

ser derivado de um gene M3A de *A. faecalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 28, um gene mmsB KT2440 ou E23440 de *P. putida* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 30 ou SEQ ID NO: 31, respectivamente, ou um gene mmsB PAO1 de *P. aeruginosa* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 32. Em certas formas de realização, um gene pode de HIBADH codifica uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido apresentada nas SEQ ID NOs: 28, 30, 31, ou 32.

[0106] Um “gene de 4-hidroxibutirato desidrogenase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de 4-hidroxibutirato desidrogenase, significando a capacidade para catalisar a conversão de 4-hidroxibutanoato para succinato semialdeído. As enzimas tendo a atividade de 4-hidroxibutirato desidrogenase são classificadas como EC 1.1.1.61. Algumas 4-hidroxibutirato desidrogenases também têm atividade de 3-HPDH. Em certas formas de realização, um gene de 4-hidroxibutirato desidrogenase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de 4-hidroxibutirato desidrogenase pode ser derivado de um gene H16 4hbd de *R. eutropha* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 33 ou um gene DSM 555 hbd de *C. kluyveri* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 34. Em outras formas de realização, o gene pode codificar uma sequência de aminoácido com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido apresentada nas SEQ ID NOs: 33 ou 34.

[0107] Um “gene de PEP carboxicinase” ou “gene de PCK”

como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de PEP carboxicinase, significando a capacidade para catalisar a conversão de PEP, CO₂, e ADP ou GDP para OAA e ATP ou GTP, ou vice e versa. As enzimas tendo atividade de PEP carboxicinase são classificadas como EC 4.1.1.32 (utilizando GTP/GDP) e EC 4.1.1.49 (utilizando ATP/ADP). Em certas formas de realização, um gene de PCK pode ser derivado de uma fonte de levedura. Em outras formas de realização, um gene de PCK pode ser derivado de uma fonte bacteriana, e em certas destas formas de realização o gene pode ser derivado de uma bactéria em que a reação de PCK favorece a produção de OAA ao invés da forma mais comum da reação onde a descarboxilação é dominante. Por exemplo, um gene de PCK pode ser derivado de um gene de PCK de *M. succiniciproducens* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 35, um gene de PCK da *A. succiniciproducens* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 36, um gene de PCK da *A. succinogenes* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 37, ou um gene de PCK de *R. eutropha* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 38. Em outras formas de realização, um gene de PCK sofreu uma ou mais mutações versus o gene nativo a partir do qual foi derivado, tal que o gene resultante codifica um polipeptídeo que preferivelmente catalisa a conversão de PEP para OAA. Por exemplo, um gene de PCK pode ser derivado de um gene de PCK da cepa *K12* da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 39, onde o gene foi mutado para preferivelmente catalisar a conversão de PEP para OAA. Em outras formas de realização a conversão de PEP para OAA é catalisada por uma PEP carboxitransfosforilase tal como é encontrado nas bactérias do ácido propiônico (por exemplo, *P. shermanii*, *A. woodii*) que usa fosfato e difosfato inorgânicos ao invés de ATP/ADP ou GTP/GDP.

[0108] Um “gene de malato desidrogenase” como aqui

usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de malato desidrogenase, significando a capacidade para catalisar a conversão de OAA para malato. Em certas formas de realização, um gene de malato desidrogenase pode ser derivado de uma fonte bacteriana ou de levedura.

[0109] Um “gene de malato descarboxilase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com a atividade de malato descarboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de malato para 3-HP. A atividade da malato descarboxilase não é conhecida ocorrer naturalmente. Portanto, um gene de malato descarboxilase pode ser derivado pela incorporação de uma ou mais mutações em uma fonte de gene nativo que codifica um polipeptídeo com atividade de acetolactato descarboxilase. Os polipeptídeos com atividade de acetolactato descarboxilase catalisam a conversão de 2-hidróxi-2-metil-3-oxobutanoato para 2-acetoína, e são classificados como EC 4.1.1.5. Em certas formas de realização, um gene de malato descarboxilase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de malato descarboxilase pode ser derivado de um gene de AldB de *L. lactis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 40, um gene de AldB de *S. thermophilus* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 41, um gene de AldB de *B. brevis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 42, ou um gene de BudA de *E. aerogenes* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 43.

[0110] Um “gene de alfa-cetoglutarato (AKG) descarboxilase” ou “gene de KGD” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de alfa-cetoglutarato descarboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de alfa-cetoglutarato (2-oxoglutarato) para succinato semialdeído. As enzimas tendo atividade de AKG descarboxilase são classificadas como EC 4.1.1.71. Um gene de KGD pode ser usado para derivar um gene que codifica um

polipeptídeo capaz de catalisar a conversão de OAA para malonato semialdeído. Esta atividade pode ser encontrada em um gene de KGD nativo, ou pode ser derivada pela incorporação de uma ou mais mutações dentro de um gene de KGD nativo. Em certas formas de realização, um gene de KGD pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de KGD pode ser derivado de um gene de KGD de *M. tuberculosis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 44, um gene de KGD de *B. japonicum* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 45, ou um gene de KGD de *M. loti* (também conhecido como *Rhizobium loti*) que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 46.

[0111] Um “gene de alfa-ceto ácido descarboxilase de cadeia ramificada” ou “gene de BCKA” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de alfa-ceto ácido descarboxilase de cadeia ramificada, que pode servir para descarboxilar uma faixa de alfa-ceto ácidos de três a seis carbonos no comprimento. As enzimas tendo atividade de BCKA são classificadas como EC 4.1.1.72. Um gene de BCKA pode ser usado para derivar um gene que codifica um polipeptídeo capaz de catalisar a conversão de OAA para malonato semialdeído. Esta atividade pode ser encontrada em um gene de BCKA nativo, ou pode ser derivada pela incorporação de uma ou mais mutações dentro de um gene de BCKA nativo. Em certas formas de realização, um gene de BCKA pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de BCKA pode ser derivado de um gene *kdcA* de *L. lactis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 47.

[0112] Um “gene de indolpiruvato descarboxilase” ou “gene de IPDA” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de indolpiruvato descarboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de indolpiruvato para indolacetaldeído.

As enzimas tendo atividade de IPDA são classificadas como EC 4.1.1.74. Um gene de IPDA pode ser usado para derivar um gene que codifica um polipeptídeo capaz de catalisar a conversão de OAA para a malonato semialdeído. Esta atividade pode ser encontrada em um gene de IPDA nativo, ou pode ser derivado pela incorporando uma ou mais mutações em um gene de IPDA nativo. Em certas formas de realização, um gene de indolpiruvato descarboxilase pode ser derivado de uma fonte de levedura, bacteriana, ou de planta.

[0113] Um “gene de piruvato descarboxilase” ou “gene de PDC” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de piruvato descarboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de piruvato para acetaldeído. As enzimas tendo atividade de PDC são classificadas como EC 4.1.1.1. Em formas de realização preferidas, um gene de PDC que é incorporado dentro de uma célula de levedura modificada como aqui fornecida sofreu uma ou mais mutações versus o gene nativo a partir do qual o mesmo foi derivado tal que o gene resultante codifica um polipeptídeo capaz de catalisar a conversão de OAA para a malonato semialdeído. Em certas formas de realização, um gene de PDC pode ser derivado de uma fonte de levedura. Por exemplo, um gene de PDC pode ser derivado de um gene de PDC de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 49, um gene de PDC1 de *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 50, ou um PDC de *K. lactis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 51. Em certas formas de realização, um gene de PDC derivado do gene de PDC de *I. orientalis* pode compreender a sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 48 ou uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de

nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 48. Em outras formas de realização, um gene de PDC pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de PDC pode ser derivado de um gene de PDC de *Z. mobilis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 52 ou um gene de PDC de *A. pasteurianus* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 53.

[0114] Um gene de “benzoilformiato descarboxilase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de benzoilformiato descarboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de benzoilformiato para benzaldeído. As enzimas tendo atividade de benzoilformiato descarboxilase são classificadas como EC 4.1.1.7. Em formas de realização preferidas, um gene de benzoilformiato descarboxilase que é incorporada dentro de uma célula de levedura modificada como aqui fornecida sofreu uma ou mais mutações versus o gene nativo a partir do qual foi derivada tal que o gene resultante codifica um polipeptídeo capaz de catalisar a conversão de OAA para malonato semialdeído. Em certas formas de realização, um gene de benzoilformiato descarboxilase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de benzoilformiato descarboxilase pode ser derivado de um gene *mdlC* de *P. putida* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 54, um gene *mdlC* de *P. aeruginosa* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 55, um gene *dpgB* de *P. stutzeri* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 56, ou um gene *ilvB-1* de *P. fluorescens* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 57.

[0115] Um “gene de OAA formiatoliase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de OAA formiatoliase, significando a capacidade para catalisar a conversão de um acilato cetoácido para o seu derivado de CoA correspondente. Um

polipeptídeo codificado por um gene de OAA formiatoliase pode ter atividade de em piruvato ou em outro cetoácido. Em certas formas de realização, um gene de OAA formiatoliase codifica um polipeptídeo que converte OAA para malonil-CoA.

[0116] Um “gene de malonil-CoA redutase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade da malonil-CoA redutase, significando a capacidade para catalisar a conversão de malonil-CoA para malonato semialdeído (também aludido como atividade de malonato semialdeído desidrogenase que acila Co-A). Em certas formas de realização, um gene de malonil-CoA redutase pode ser derivado de um gene de malonil-CoA redutase bifuncional que também tem a capacidade para catalisar a conversão da malonato semialdeído para 3-HP. Em certas destas formas de realização, um gene de malonil-CoA redutase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de malonil-CoA redutase pode ser derivado de um gene de malonil-CoA redutase de *C. aurantiacus* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 58, um gene de malonil-CoA redutase *R. castenholzii* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 59, ou um gene *NAP1* da malonil-CoA redutase de *Erythrobacter sp.* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 60. Em outras formas de realização, um gene de malonil-CoA redutase pode ser derivado de um gene de malonil-CoA redutase que codifica um polipeptídeo que apenas catalisa a conversão de malonil-CoA para malonato semialdeído. Por exemplo, um gene de malonil-CoA redutase pode ser derivado de um gene Msed_0709 de *M. sedula* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 61 ou uma malonil-CoA redutase de *S. tokodaii* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 62.

[0117] Um “gene de piruvato desidrogenase” ou “gene de PDH” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um

polipeptídeo com atividade de piruvato desidrogenase, significando a capacidade para catalisar a conversão de piruvato para acetil-CoA. Em certas formas de realização, um gene de PDH pode ser derivado de uma fonte de levedura. Por exemplo, um gene de PDH pode ser derivado de um gene LAT1, PDA1, PDB1, ou LPD da *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada nas SEQ ID NOs: 63-66, respectivamente. Em outras formas de realização, um gene de PDH pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de PDH pode ser derivado de um gene de aceE, aceF, ou lpd da *cepa K12 substr. MG1655* da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido apresentada nas SEQ ID NOs: 67-69, respectivamente, ou um gene de PdhA, pdhB, pdhC, ou pdhD de *B. subtilis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada nas SEQ ID NOs: 70-73, respectivamente.

[0118] Um “gene de acetil-CoA carboxilase” ou “gene de ACC” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de acetil-CoA carboxilase, significando a capacidade para catalisar a conversão de acetil-CoA para malonil-CoA. As enzimas tendo atividade de acetil-CoA carboxilase são classificadas como EC 6.4.1.2. Em certas formas de realização, um gene de acetil-CoA carboxilase pode ser derivado de uma fonte de levedura. Por exemplo, um gene de acetil-CoA carboxilase pode ser derivado de um gene de ACC1 de *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 74. Em outras formas de realização, um gene de acetil-CoA carboxilase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de acetil-CoA carboxilase pode ser derivado de um gene de AccA, accB, accC, ou accD da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NOs: 75-78, respectivamente, ou um gene de AccA, accB, accC, ou accD da *C. aurantiacus* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NOs: 79-82, respectivamente.

[0119] Um “gene de alanina desidrogenase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de alanina desidrogenase, significando a capacidade para catalisar a aminação redutiva dependente de NAD de piruvato para alanina. As enzimas tendo atividade de alanina desidrogenase são classificadas como EC 1.4.1.1. Em certas formas de realização, um gene de alanina desidrogenase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de alanina desidrogenase pode ser derivado de um gene de alanina desidrogenase de *B. subtilis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 83.

[0120] Um “gene de piruvato/alanina aminotransferase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de piruvato/alanina aminotransferase, significando a capacidade para catalisar a conversão de piruvato e L-glutamato para alanina e 2-oxoglutarato. Em certas formas de realização, um gene de piruvato/alanina aminotransferase é derivado de uma fonte de levedura. Por exemplo, um gene de piruvato/alanina aminotransferase pode ser derivado de um gene de piruvato/alanina aminotransferase de *S. pombe* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 84 ou um gene de ALT2 de *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 85.

[0121] Um “gene de alanina 2,3 aminomutase” ou “gene de AAM” como aqui usado refere-se a um gene que codifica um polipeptídeo com atividade de alanina 2,3 aminomutase, significando a capacidade para catalisar a conversão de alanina para β -alanina. A atividade de alanina 2,3 aminomutase não é conhecida ocorrer naturalmente. Portanto, um gene de alanina 2,3 aminomutase pode ser derivado pela incorporação de uma ou mais mutações dentro de um gene de fonte nativa que codifica um polipeptídeo com atividade similar tal como a atividade de lisina 2,3 aminomutase (ver, por

exemplo, a Patente US 7.309.597). Em certas formas de realização, a fonte de gene nativa pode ser um gene de lisina 2,3 aminomutase de *B. subtilis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 86, um gene de lisina 2,3 aminomutase de *P. gingivalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 87, ou um gene de lisina 2,3 aminomutase de *F. nucleatum* (ATCC-10953) que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 88.

[0122] Um “gene de CoA transferase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de CoA transferase, que em um exemplo inclui a capacidade para catalisar a conversão de β -alanina para β -alanil-CoA e/ou a conversão de lactato para lactil-CoA. Em certas formas de realização, um gene de CoA transferase pode ser derivado de uma fonte de levedura. Em outras formas de realização, um gene de CoA transferase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de CoA transferase pode ser derivado de um gene de CoA transferase de *M. elsdenii* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 89.

[0123] Um “gene de CoA sintetase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com a atividade da CoA sintetase. Em um exemplo isto inclui a capacidade para catalisar a conversão de β -alanina para β -alanil-CoA. Em outro exemplo, isto inclui a capacidade para catalisar a conversão de lactato para lactil-CoA. Em certas formas de realização, um gene de CoA sintetase pode ser derivado de uma fonte de levedura. Por exemplo, um gene de CoA sintetase pode ser derivado de um gene de CoA sintetase de *S. cerevisiae*. Em outras formas de realização, um gene de CoA sintetase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de CoA sintetase pode ser derivado de um gene de CoA sintetase da *E. coli*, *R. sphaeroides*, ou *S. enterica*.

[0124] Um “gene de β -alanil-CoA amônia liase” como aqui

usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de β -alanil-CoA amônia liase, significando a capacidade para catalisar a conversão de β -alanil-CoA para acrilil-CoA. Em certas formas de realização, um gene de β -alanil-CoA amônia liase pode ser derivado de uma fonte bacteriana, tal como um gene de β -alanil-CoA amônia liase de *C. propionicum* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 90.

[0125] Um “gene de 3-HP-CoA desidratase” ou “gene de Acrilil-CoA hidratase” como aqui usados referem-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com a atividade do gene de 3-HP-CoA desidratase, significando a capacidade para catalisar a conversão de acrilil-CoA para 3-HP-CoA. As enzimas tendo atividade de 3-HP-CoA desidratase são classificadas como EC 4.2.1.116. Em certas formas de realização, um gene de 3-HP-CoA desidratase pode ser derivado de uma fonte de levedura ou fúngica, tal como um gene de 3-HP-CoA desidratase de *P. sojae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 91. Em outras formas de realização, um gene de 3-HP-CoA desidratase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de 3-HP-CoA desidratase pode ser derivado de um gene de 3-HP-CoA desidratase de *C. aurantiacus* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 92, um gene de 3-HP-CoA desidratase de *R. rubrum* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 93, ou um gene de 3-HP-CoA desidratase de *R. capsulatus* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 94. Ainda em outras formas de realização, um gene de 3-HP-CoA desidratase pode ser derivado de uma fonte mamífera. Por exemplo, um gene de 3-HP-CoA desidratase pode ser derivado de um gene de 3-HP-CoA desidratase de *H. sapiens* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 95.

[0126] Um “gene de 3-HP-CoA hidrolase” como aqui usado

refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de 3-HP-CoA hidrolase, significando a capacidade para catalisar a conversão de 3-HP-CoA para 3-HP. Em certas formas de realização, um gene de 3-HP-CoA pode ser derivado de uma fonte de levedura ou fúngica. Em outras formas de realização, um gene de 3-HP-CoA pode ser derivado de uma fonte bacteriana ou mamífera.

[0127] Um “gene de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, que em um exemplo inclui a capacidade para catalisar a conversão de 3-HP-CoA para 3-HP. Em certas formas de realização, um gene de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase pode ser derivado de uma fonte bacteriana, tal como um gene de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase de *P. fluorescens* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 96 ou um gene de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase de *B. cereus* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 97. Em outras formas de realização, um gene de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase pode ser derivado de uma fonte mamífera, tal como um gene de *H. sapiens* 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 98.

[0128] Um “gene de lactato desidrogenase” ou “gene de LDH” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de lactato desidrogenase, significando a capacidade para catalisar a conversão de piruvato para lactato. Em certas formas de realização, um gene de LDH pode ser derivado de uma fonte fúngica, bacteriana, ou mamífera.

[0129] Um “gene de lactil-CoA desidratase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de lactil-CoA desidratase, significando a capacidade para catalisar a conversão de lactil-CoA para acrilil-CoA. Em certas formas de realização, um

gene de lactil-CoA desidratase pode ser derivado de uma fonte bacteriana. Por exemplo, um gene de lactil-CoA desidratase pode ser derivado de um gene de subunidades de lactil-CoA desidratase EI, EIIa, ou EIIb de *M. elsdenii* que codificam as sequências de aminoácido apresentadas nas SEQ ID NOs: 99 a 101.

[0130] Um “gene de aldeído desidrogenase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica uma atividade de polipeptídeo com aldeído desidrogenase, que em um exemplo inclui a capacidade para catalisar a conversão de 3-HPA para 3-HP e vice e versa. Em certas formas de realização, um gene de aldeído desidrogenase pode ser derivado de uma fonte de levedura, tal como um gene de aldeído desidrogenase de *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 102 ou um gene de aldeído desidrogenase de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada nas SEQ ID NOs: 122, 124, ou 126. Em outras formas de realização, uma aldeído desidrogenase pode ser derivada de uma fonte bacteriana, tal como um gene de AldH da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 103 ou um gene de aldeído desidrogenase de *K. pneumoniae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 104.

[0131] Um “gene de glicerol desidratase” como aqui usado refere-se a qualquer gene que codifica um polipeptídeo com atividade de glicerol desidratase, significando a capacidade para catalisar a conversão de glicerol para 3-HPA. Em certas formas de realização, um gene de glicerol desidratase pode ser derivado de uma fonte bacteriana, tal como um gene de glicerol desidratase de *K. pneumonia* ou *C. freundii*.

[0132] Em certas formas de realização, as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas compreendem ainda uma deleção ou rompimento de um ou mais genes nativos. “Deleção ou rompimento” com respeito a um gene nativo significa que a região

codificadora inteira do gene é eliminada (deleção) ou a região codificadora do gene, seu promotor, e/ou sua região terminadora são modificadas (tal como pela deleção, inserção, ou mutação) tal que o gene não mais produz uma enzima ativa, produz uma quantidade severamente reduzida (pelo menos 75% de redução, preferivelmente pelo menos 90% de redução) de uma enzima ativa, ou produz uma enzima com atividade severamente reduzida (pelo menos 75% reduzida, preferivelmente pelo menos 90% reduzida).

[0133] Em certas formas de realização, a deleção ou rompimento de um ou mais genes nativos resulta em uma deleção ou rompimento de um ou mais caminhos metabólicos nativos. “Deleção ou rompimento” com respeito a um caminho metabólico significa que o caminho é inoperante ou ainda exibe atividade que é reduzida em pelo menos 75%, pelo menos 85%, ou pelo menos 95% em relação ao caminho nativo. Em certas formas de realização, a deleção ou rompimento de um caminho metabólico nativo é realizada pela incorporação de uma ou mais modificações genéticas que resultam em expressão diminuída de um ou mais genes nativos que reduzem a produção de 3-HP.

[0134] Em certas formas de realização, a deleção ou rompimento de gene nativo pode ser realizado pela evolução forçada, mutagênese, ou métodos de engendramento genético, seguido pela seleção ou triagem apropriada para identificar os mutantes desejados. Em certas formas de realização, a deleção ou rompimento de um gene de célula hospedeira nativo pode ser emparelhado para a incorporação de um ou mais genes exógenos dentro da célula hospedeira, isto é, os genes exógenos podem ser incorporados usando uma construção de integração de expressão de gene que também é uma construção de deleção. Em outras formas de realização, a deleção ou rompimento podem ser realizados usando uma construção de deleção que não contém um gene exógeno ou por outros métodos conhecidos na técnica.

[0135] Em certas formas de realização, as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas compreendem uma deleção ou rompimento de um ou mais genes nativos que codificam uma enzima envolvida na fermentação de etanol, incluindo, por exemplo, os genes da piruvato descarboxilase (PDC, converte piruvato para acetaldeído) e/ou álcool desidrogenase (ADH converte acetaldeído para etanol). Estas modificações diminuem a capacidade de levedura para produzir etanol, maximizando, deste modo, a produção de 3-HP. Entretanto, em certas formas de realização as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas podem ser engendradas para coproduzir 3-HP e etanol. Nestas formas de realização, os genes nativos que codificam uma enzima envolvida na fermentação de etanol preferivelmente não são deletados ou rompidos, e em certas formas de realização as células de levedura podem compreender um ou mais genes exógenos que aumentam a produção de etanol.

[0136] Em certas formas de realização, as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas compreendem uma deleção ou rompimento de um ou mais genes nativos que codificam uma enzima envolvida na produção de produtos fermentativos alternativos tais como glicerol ou outros subprodutos tais como acetato ou dióis. Por exemplo, as células aqui fornecidas podem compreender uma deleção ou rompimento de um ou mais genes da glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPD, catalisa a reação do fosfato de di-hidroxiacetona para glicerol 3-fosfato), glicerol 3-fosfatase (GPP, catalisa a conversão de glicerol-3 fosfato para glicerol), glicerol cinase (catalisa conversão de glicerol 3-fosfato para glicerol), di-hidroxiacetona cinase (catalisa conversão de fosfato de di-hidroxiacetona para di-hidroxiacetona), glicerol desidrogenase (catalisa a conversão de di-hidroxiacetona para glicerol), aldeído desidrogenase (ALD, por exemplo, converte acetaldeído para acetato ou 3-HP para 3-HPA), ou butanodiol desidrogenase (catalisa a conversão de butanodiol para acetoína e vice e

versa).

[0137] Em certas formas de realização, as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas compreendem uma deleção ou rompimento de um ou mais genes nativos que codificam uma enzima que catalisa uma reação reversa em um caminho de fermentação de 3-HP, incluindo, por exemplo, PEP carboxicinase (PCK), enzimas com atividade de OAA descarboxilase, ou CYB2A ou CYB2B (catalisa a conversão de lactato para piruvato). PCK catalisa a conversão de PEP para OAA e vice e versa, mas exhibe uma preferência para a reação de OAA para PEP. para reduzir a conversão de OAA para PEP, uma ou mais cópias de um gene nativo de PCK pode ser deletada ou rompida. Em certas formas de realização, as células de levedura nas quais um ou mais genes nativos de PCK foram deletados ou rompidos podem expressar um ou mais genes exógenos de PCK que foram mutados para codificar um polipeptídeo que favorece a conversão de PEP para OAA. A OAA descarboxilase catalisa a conversão de OAA para piruvato. As enzimas com atividade de OAA descarboxilase foram identificadas, tais como aquelas codificadas pelo gene *eda* na *E. coli* e enzima málica (MAE) em levedura e fungos. Para reduzir a atividade de OAA descarboxilase, uma ou mais cópias de um gene nativo que codifica uma enzima com atividade de OAA descarboxilase podem ser deletadas ou rompidas. Em certas formas de realização, as células de levedura nas quais um ou mais genes da descarboxilação de OAA nativos foram deletados ou rompidos podem expressar um ou mais genes da descarboxilação de OAA exógenos que foram mutados para codificar um polipeptídeo que catalisa a conversão de piruvato para OAA.

[0138] Em certas formas de realização, as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas compreendem uma deleção ou rompimento de um ou mais genes nativos que codificam uma enzima envolvida em uma reação indesejada com um produto ou

intermediário do caminho de fermentação de 3-HP. Os exemplos de tais genes de Incluem aqueles que codificam uma enzima que converte 3HP para um aldeído de 3HP, que são conhecidos como sendo tóxicos para as células bacterianas.

[0139] Em certas formas de realização, as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas compreendem uma deleção ou rompimento de um ou mais genes nativos que codificam uma enzima que tem um efeito neutro sobre um caminho de fermentação de 3-HP, incluindo, por exemplo, GAL6 (regulador negativo do sistema GAL que converte galactose para glicose). A deleção ou rompimento de genes neutros permite a inserção de um ou mais genes exógenos sem afetar caminhos de fermentação nativos.

[0140] Em certas formas de realização, como as células de levedura são aqui fornecidas células de levedura resistentes a 3-HP. Uma “célula de levedura resistente a 3-HP” como aqui usado refere-se a uma célula de levedura que exibe uma taxa glicolítica média de pelo menos 2,5 g/L/h em média contendo 75 g/L ou mais de 3-HP em um pH de menos do que 4,0. tais taxas e condições representam um processo econômico para produzir 3-HP. Em certas destas formas de realização, as células de levedura podem exibir resistência a 3-HP na sua forma nativa. Em outras formas de realização, as células podem ter sofrido mutação e/ou seleção (por exemplo, seleção de quimiostato ou subcultivo serial repetido) antes, durante, ou depois da introdução de modificações genéticas relacionadas com um caminho de fermentação de 3-HP ativo, tal que as células mutadas e/ou selecionadas possuem um grau mais alto de resistência para 3-HP do que as células do tipo selvagem da mesma espécie. Por exemplo, em algumas formas de realização, as células têm sofrido mutação e/ou seleção na presença de 3-HP ou ácido láctico antes de serem geneticamente modificadas com um ou mais genes exógenos do caminho de 3-HP. Em certas formas de realização, a mutação

e/ou seleção podem ser realizadas nas células que exibem resistência a 3-HP na sua forma nativa. As células que têm sofrido mutação e/ou seleção podem ser testadas quanto ao consumo de açúcar e outras características na presença de níveis variáveis de 3-HP de modo a determinar o seu potencial como hospedeiros industriais para a produção de 3-HP. Além da resistência a 3-HP, as células de levedura aqui fornecidas pode ter sofrido mutação e/ou seleção para a resistência a um ou mais ácidos orgânicos adicionais (por exemplo, ácido láctico) ou a outros produtos de fermentação, subprodutos, ou componentes de meio.

[0141] A seleção, tal como a seleção quanto à resistência para 3-HP ou para outros compostos, pode ser realizada usando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, como mencionado *supra*, a seleção pode ser seleção de quimiostato. A seleção de quimiostato usa um quimiostato que permite uma cultura contínua de micro-organismos (por exemplo, levedura) em que a taxa de crescimento e o número de célula específico podem ser controlados independentemente. Uma cultura contínua é essencialmente um sistema de fluxo de volume constante ao qual o meio é adicionado continuamente e a partir do qual a remoção contínua de qualquer excesso pode ocorrer. Uma vez que tal sistema está em equilíbrio, o número de célula e a situação dos nutrientes permanecem constantes, e o sistema está em um estado estável. Um quimiostato permite o controle tanto da densidade populacional quanto da taxa de crescimento específica de uma cultura através da taxa de diluição e alteração da concentração de um nutriente limitante, tal como uma fonte de carbono ou nitrogênio. Pela alteração das condições conforme uma cultura está crescendo (por exemplo, diminuindo a concentração de uma fonte de carbono secundária necessária para o crescimento da cepa de inóculo, entre outros), micro-organismos na população que são capazes de crescer mais rápido nas condições alteradas serão selecionados e superarão em crescimento os micro-organismos que não

funcionam tão bem sob as novas condições. Tipicamente tal seleção requer o aumento ou diminuição progressivos de pelo menos um componente de cultura no curso de crescimento da cultura de quimiostato. A operação de quimiostatos e o seu uso na evolução direcionada de micro-organismos é bem conhecido na técnica (ver, por exemplo, Novick Proc Natl Acad Sci USA 36: 708-719 (1950), Harder J Appl Bacteriol 43: 1-24 (1977)). Outros métodos para a seleção incluem, mas não são limitados a, subcultura serial repetida sob as condições seletivas como descrito, por exemplo, na Patente U.S. No. 7.629.162. Tais métodos podem ser usados no lugar de, ou além de, usar o método do quimiostato limitado em glicose descrito acima.

[0142] As cepas de levedura que exibem as melhores combinações de crescimento e consumo de glicose em meios de 3-HP, como divulgado nos exemplos abaixo, são células hospedeiras preferidas para várias modificações genéticas que dizem respeito aos caminhos da fermentação de 3-HP. Os gêneros de levedura que possuem o potencial para um grau relativamente alto de resistência para 3-HP, como indicado pelo crescimento na presença de 75 g/L de 3-HP ou mais alto em um pH de menos do que 4, incluem por exemplo *Candida*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, e *Zygosaccharomyces*. As espécies que exibem resistência a 3-HP incluem *I. orientalis* (também conhecido como *C. krusei*), *C. lambica* (também conhecido como *Pichia fermentans*), e *S. bulderi* (também conhecido como *Kazachstania bulderi*). *I. orientalis* e *C. lambica* são do clado *I. orientalis/P. fermentans*, enquanto que a *S. bulderi* é do clado *Saccharomyces*. As cepas específicas que exibem resistência a 3-HP incluem as cepas 24210, PTA-6658, 60585, e CD1822 de *I. orientalis*, cepas MYA-402 e MYA-404 de *S. bulderi*, e cepa ATCC 38617 de *C. lambica*.

[0143] Outras leveduras ou fungos do tipo selvagem podem ser testadas em uma maneira similar e identificadas terem níveis aceitáveis de

crescimento e utilização de glicose na presença de altos níveis de 3-HP como aqui descritos. Por exemplo, Gross e Robbins (Hydrobiology 433(103): 91-109) têm compilado uma lista de 81 espécies fúngicas identificadas em ambientes com pH baixo (<4) que podem ser relevantes para testar como hospedeiros de produção potenciais.

[0144] Em certas formas de realização, as células modificadas de levedura são aqui fornecidas geradas pela incorporação de uma ou mais modificações genéticas em uma célula hospedeira de levedura negativa em Crabtree. Em certas destas formas de realização a célula hospedeira de levedura pertence aos gêneros *Issatchenkia*, *Candida*, ou *Saccharomyces*, e em certas destas formas de realização a célula hospedeira pertence ao clado *I. orientalis*/*P. fermentans* ou *Saccharomyces*. Em certas das formas de realização, a célula hospedeira é *I. orientalis* ou *C. lambica*, ou *S. bulderi*.

[0145] O clado *I. orientalis*/*P. fermentans* é o clado mais terminal que contém pelo menos a espécie *I. orientalis*, *P. galeiformis*, *P. sp. YB-4149* (designação NRRL), *C. etanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifaciens*, e *P. fermentans*. Os membros do clado *I. orientalis*/*P. fermentans* são identificados pela análise do domínio variável D1/D2 do DNA 26S ribossômico das espécies de levedura, usando o método descrito por Kurtzman e Robnett em "Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeast from Analysis of Nuclear Large Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences," *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371, 1998, aqui incorporada por referência (ver especialmente p. 349). A análise do domínio variável D1/D2 do DNA 26S ribossômico de centenas de ascomicetos tem revelado que o clado *I. orientalis*/*P. fermentans* contém espécies muito intimamente relacionadas. Membros do clado *I. orientalis*/*P. fermentans* que exibem maior similaridade no domínio D1/D2 variável do DNA 26S ribossômico a outros membros do clado do que às espécies de levedura fora do clado. Portanto,

outros membros do clado *I. orientalis*/*P. fermentans* podem ser identificados pela comparação dos domínios D1/D2 de seus respectivos DNAs ribossômicos e comparando com aquele de outros membros do clado e espécie intimamente relacionada fora do clado, usando métodos de Kurtzman e Robnett.

[0146] Em certas formas de realização, as células de levedura geneticamente modificadas aqui fornecidas pertencem aos gêneros *Issatchenkia*, e em certas destas formas de realização as células de levedura são *I. orientalis*. Quando primeiro caracterizada, à espécie *I. orientalis* foi atribuído o nome *Pichia kudriavzevii*. O anamorfo (forma assexual) de *I. orientalis* é conhecida como *Candida krusei*. Numerosos sinônimos adicionais para a espécie *I. orientalis* foram listados em outro lugar (Kurtzman e Fell, The Yeasts, a Taxonomic Study. Seção 35. *Issatchenkia Kudryavtsev*, pp 222-223 (1998)).

[0147] A célula de levedura ideal para a produção de 3-HP é idealmente capaz de crescer em níveis de pH baixos. A capacidade para conduzir a fermentação em um pH baixo diminui os custos de recuperação a jusante, resultando em produção mais econômica. Portanto, em certas formas de realização a célula hospedeira de levedura é capaz de crescer em níveis de pH baixos (por exemplo, em níveis de pH menores do que 7, 6, 5, 4, ou 3).

[0148] Uma célula hospedeira adequada pode possuir uma ou mais características favoráveis além da resistência a 3-HP e/ou capacidade de crescer em pH baixo. Por exemplo, células hospedeiras potenciais que exibem resistência a 3-HP podem ser selecionadas ainda com base nas taxas glicolíticas, taxas de crescimento específicas, termotolerância, tolerância aos inibidores de hidrolisado de biomassa, robustez de processo global, e assim por diante. Estes critérios podem ser avaliados antes de qualquer modificação genética que diz respeito a um caminho de fermentação de 3-HP, ou eles podem ser avaliados depois que uma ou mais de tais modificações tenham

ocorrido.

[0149] Por que a maior parte das leveduras são produtores nativos de etanol, a eliminação ou redução severa na enzima que catalisa a primeira etapa na produção de etanol a partir do piruvato (PDC) é requerida para rendimento suficiente de um produto alternativo. Na levedura positiva em Crabtree tal como *Saccharomyces*, um gene de PDC deletado ou rompido faz com que o hospedeiro adquira uma auxotrofia para compostos de dois carbonos tais como etanol ou acetato, e causa uma falta de crescimento em meios contendo glicose. Mutantes capazes de superar estas limitações podem ser obtidos usando a seleção progressiva quanto à independência de acetato e tolerância à glicose (ver, por exemplo, van Maris Appl Environ Microbiol 70: 159 (2004)). Portanto, em certas formas de realização uma célula hospedeira de levedura preferida é uma célula de levedura negativa em Crabtree, em que as cepas de deleção da PDC são capazes de crescer em glicose e reter a prototrofia C2.

[0150] O nível de expressão de gene e/ou o número de genes exógenos a serem utilizados em uma dada célula variará dependendo das espécies de levedura selecionadas. Para as leveduras totalmente sequenciadas no genoma, modelos estequiométricos de genoma integral podem ser usados para determinar quais enzimas devam ser expressas para desenvolver um caminho de fermentação de 3-HP desejado. Os modelos estequiométricos de genoma integral são descritos, por exemplo, em Hjersted *et al.*, “Genome-scale analysis of *Saccharomyces cerevisiae* metabolism and ethanol production in fed-batch culture,” *Biotechnol. Bioeng.* 2007; e Famili *et al.*, “*Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network,” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100(23): 13134-9.

[0151] Para as leveduras sem uma sequência de genoma conhecida, as sequências para genes de interesse (como candidatos de

superexpressão ou como sítios de inserção) podem ser tipicamente obtidas usando técnicas tais como aquelas descritas abaixo no Exemplo 2A. O planejamento experimental de rotina pode ser utilizado para testar a expressão de vários genes e atividade de várias enzimas, incluindo genes e enzimas que funcionam em um caminho de 3-HP. Experimentos podem ser conduzidos em que cada enzima é expressa na levedura individualmente e em blocos de enzimas até, e incluindo preferivelmente, todas as enzimas do caminho, para estabelecer quais são necessários (ou desejados) para a produção de 3-HP melhorada. Um planejamento experimental ilustrativo testa a expressão de cada enzima individual assim como de cada par único de enzimas, e pode testar ainda a expressão de todas as enzimas requeridas, ou cada combinação única de enzimas. Vários métodos podem ser adotados, como será avaliado.

[0152] Em certas formas de realização, métodos são fornecidos para produzir 3-HP a partir de uma célula de levedura geneticamente modificada como aqui fornecida. Em certas formas de realização, estes métodos compreendem cultivar uma célula de levedura geneticamente modificada como aqui fornecida na presença de pelo menos uma fonte de carbono, deixando a célula produzir 3-HP por um período de tempo, e depois isolando o 3-HP produzido pela célula da cultura. A fonte de carbono pode ser qualquer fonte de carbono que possa ser fermentada pela levedura fornecida. A fonte de carbono pode ser um açúcar de doze carbonos tal como sacarose, um sugar de hexose tal como glicose ou frutose, glicano ou outro polímero de glicose, oligômeros de glicose tais como maltose, maltotriose e isomaltotriose, oligômeros de panose, e frutose. Se a célula é modificada para comunicar uma capacidade para fermentar açúcares de pentose, o meio de fermentação pode incluir um açúcar de pentose tal como xilose, xilano ou outro oligômero de xilose, e/ou arabinose. Tais açúcares de pentose são adequadamente hidrolisados de uma biomassa contendo hemicelulose. No caso de açúcares oligoméricos, pode ser necessário

adicionar enzimas ao caldo de fermentação de modo a digerir estes para o açúcar monomérico correspondente para a fermentação pela célula. Em certas formas de realização, mais do que um tipo de célula de levedura geneticamente modificada pode estar presente na cultura. Do mesmo modo, em certas formas de realização uma ou mais células de levedura nativas da mesma ou de uma espécie diferente da célula de levedura geneticamente modificada pode estar presente na cultura.

[0153] Em certas formas de realização, o cultivo das células aqui fornecidas para produzir 3-HP pode ser dividido em fases. Por exemplo, o processo de cultura de célula pode ser dividido em uma fase de cultivo, uma fase de produção, e uma fase de recuperação. Uma pessoa de habilidade comum na técnica reconhecerá que as condições usadas para estas fases podem ser variadas com base em fatores tais como a espécie de levedura que é usada, o caminho específico de fermentação de 3-HP utilizado pela levedura, o rendimento desejado, ou outros fatores.

[0154] O meio tipicamente conterá nutrientes como requeridos pela célula particular, incluindo uma fonte de nitrogênio (tal como aminoácidos, proteínas, fontes de nitrogênio inorgânico tais como amônia ou sais de amônio, e os semelhantes), e várias vitaminas, minerais e os semelhantes. Em algumas formas de realização, as células da invenção podem ser cultivadas em um meio quimicamente definido. Em um exemplo, o meio contém em torno de 5 g/L de sulfato de amônio, em torno de 3 g/L de di-hidrogeno fosfato de potássio, em torno de 0,5 g/L de sulfato de magnésio, elementos traço, vitaminas e em torno de 150 g/L de glicose. O pH pode ser deixado variar livremente durante o cultivo, ou pode ser tamponado se necessário para impedir o pH de cair abaixo ou se elevar acima de níveis predeterminados. Em certas formas de realização, o meio de fermentação é inoculado com células de levedura suficientes que são o objeto da avaliação para produzir uma OD₆₀₀ de cerca de 1,0. A menos que explicitamente de

outro modo mencionado, a OD_{600} como aqui usada refere-se a uma densidade óptica medida em um comprimento de onda de 600 nm com uma trajetória de 1 cm usando um espectrofotômetro modelo DU600 (Beckman Coulter). A temperatura de cultivo pode variar em torno de 30 a 40°C, e o tempo de cultivo pode ser até em torno de 120 horas.

[0155] Em um exemplo, a concentração de células no meio de fermentação está tipicamente na faixa de cerca de 0,1 a 20, preferivelmente de 0,1 a 5, ainda mais preferivelmente de 1 a 3 g de células secas/litro do meio de fermentação durante a fase de produção. A fermentação pode ser conduzida aeróbica, microaeróbica, ou anaerobicamente, dependendo das exigências do caminho. Se desejado, a taxa de captação de oxigênio (OUR) pode ser variada por toda fermentação como um controle de processo (ver, por exemplo, a WO 03/102200). Em algumas formas de realização, as células modificadas de levedura são aqui fornecidas cultivadas sob condições microaeróbicas caracterizadas por uma taxa de captação de oxigênio de 2 a 45 mmol/L/h, por exemplo, de 2 a 25, de 2 a 20, de 2 a 15, de 2 a 10, de 10 a 45, de 15 a 40, de 20 a 35, ou de 25 a 35 mmol/L/h. Em certas formas de realização, as células modificadas de levedura aqui fornecidas podem realizar especialmente bem quando cultivadas sob condições microaeróbicas caracterizadas por uma taxa de captação de oxigênio de 2 a 25 mmol/L/h. O meio pode ser tamponado durante a fase de produção tal que o pH seja mantido em uma faixa de cerca de 3,0 a cerca de 7,0, ou de cerca de 4,0 a cerca de 6,0. Os agentes de tamponamento adequados são materiais básicos que neutralizam o ácido conforme o mesmo é formado, e incluem, por exemplo, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, carbonato de sódio, carbonato de amônio, amônia, hidróxido de amônio e os semelhantes. No geral, aqueles agentes de tamponamento que foram usados nos processos de fermentação convencionais também são aqui adequados.

[0156] Nestas formas de realização onde uma fermentação tamponada é utilizada, produtos de fermentação ácida podem ser neutralizados ao sal correspondente conforme eles são formados. Nestas formas de realização, a recuperação do ácido envolve a regeneração do ácido livre. Isto pode ser feito pela remoção das células e acidificando o caldo de fermentação com um ácido forte tal como ácido sulfúrico. Isto resulta na formação de um subproduto salino. Por exemplo, onde um sal de cálcio é utilizado como o agente de neutralização e ácido sulfúrico é utilizado como o agente de acidificação, gesso é produzido como um subproduto salino. Este subproduto é separado do caldo, e o ácido é recuperado usando técnicas tais como extração de líquido-líquido, destilação, absorção, e outros (ver, por exemplo, T. B. Vickroy, Vol. 3, Capítulo 38 de *Comprehensive Biotechnology*, (ed. M. Moo-Young), Pergamon, Oxford, 1985; R. Datta, *et al.*, FEMS Microbiol Rev, 1995, 16: 221-231; Patentes U.S. Nos. 4.275.234, 4.771.001, 5.132.456, 5.420.304, 5.510.526, 5.641.406, e 5.831.122, e WO93/00440.

[0157] Em outras formas de realização, o pH do meio de fermentação pode ser permitido cair durante o cultivo de um pH de partida que está no ou acima do pKa de 3-HP, tipicamente 4,5 ou mais alto, até no ou abaixo do pKa do produto de fermentação ácida, por exemplo, menos do que 4,5 ou 4,0, tal como na faixa de cerca de 1,5 a cerca de 4,5, na faixa de cerca de 2,0 a cerca de 4,0, ou na faixa de cerca de 2,0 a cerca de 3,5.

[0158] Ainda em outras formas de realização, a fermentação pode ser realizada para produzir um produto ácido pelo ajuste do pH do caldo de fermentação até ou abaixo do pKa do produto ácido antes ou no início do processo de fermentação. O pH pode ser depois disso mantido no ou abaixo do pKa do produto ácido por todo o cultivo. Em certas formas de realização, o pH pode ser mantido a menos do que 4,5 ou 4,0, tal como em uma faixa de cerca de 1,5 a cerca de 4,5, em uma faixa de cerca de 2,0 a cerca

de 4,0, ou em uma faixa de cerca de 2,0 a cerca de 3,5.

[0159] Em certas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, as células de levedura geneticamente modificadas produzem níveis relativamente baixos de etanol. Em certas formas de realização, o etanol pode ser produzido em um rendimento de 10% ou menos, preferivelmente em um rendimento de 2% ou menos. Em certas destas formas de realização, o etanol não é detectavelmente produzido. Em outras formas de realização, entretanto, 3-HP e etanol podem ser coproduzidos. Nestas formas de realização, o etanol pode ser produzido em um rendimento de mais do que 10%, mais do que 25%, ou mais do que 50%.

[0160] Em certas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, o rendimento final de 3-HP na fonte de carbono é de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou maior do que 50% do rendimento teórico. A concentração, ou título, de 3-HP será uma função do rendimento assim como a concentração de partida da fonte de carbono. Em certas formas de realização, o título pode atingir pelo menos de 1 a 3, pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, ou mais do que 50 g/L em algum ponto durante a fermentação, e preferivelmente no final da fermentação. Em certas formas de realização, o rendimento final de 3-HP pode ser aumentado pela alteração da temperatura do meio de fermentação, particularmente durante a fase de produção.

[0161] Uma vez produzido, qualquer método conhecido na técnica pode ser usado para isolar 3-HP do meio de fermentação. Por exemplo, as técnicas de separação comuns podem ser usadas para remover a biomassa do caldo, e procedimentos de isolamento comuns (por exemplo, extração, destilação, e procedimento de troca de íon) podem ser usados para se obter o 3-HP a partir do caldo isento de micro-organismo. Além disso, 3-HP pode ser isolado enquanto está sendo produzido, ou pode ser isolado do

caldo depois que a fase de produção de produto tenha sido terminada.

[0162] O 3-HP produzido usando os métodos aqui divulgados podem ser quimicamente convertidos em outros compostos orgânicos. Por exemplo, 3-HP pode ser hidrogenado para formar 1,3 propanodiol, um monômero de poliéster valioso. O propanodiol também pode ser criado a partir do 3-HP usando polipeptídeos tendo atividade de oxidorreductase *in vitro* ou *in vivo*. A hidrogenação de um ácido orgânico tal como 3-HP pode ser realizado usando qualquer método tal como aqueles usados para hidrogenar ácido succínico e/ou ácido láctico. Por exemplo, 3-HP pode ser hidrogenado usando um catalisador de metal. Em outro exemplo, 3-HP pode ser desidratado para formar ácido acrílico usando qualquer método conhecido para realizar as reações de desidratação. Por exemplo, 3-HP pode ser aquecido na presença de um catalisador (por exemplo, um catalisador de metal ou ácido mineral) para formar ácido acrílico.

[0163] Os exemplos que seguem são fornecidos para melhor ilustrar a invenção reivindicada e não devem ser interpretados como limitando o escopo da invenção. Até o grau em que materiais específicos são mencionados, é meramente para os propósitos de ilustração e não é intencionado limitar a invenção. Uma pessoa habilitada na técnica pode desenvolver meios ou reagentes equivalentes sem o exercício da capacidade inventiva e sem divergir do escopo da invenção. Será entendido que muitas variações podem ser feitas nos procedimentos aqui descritos enquanto ainda se permanece dentro dos limites da presente invenção. É a intenção dos inventores que tais variações sejam incluídas dentro do escopo da invenção.

Exemplos

Meios e Soluções

[0164] TE foi composto de 10 mM de Tris Base e 1 mM de EDTA, pH 8,0.

[0165] As placas 2X YT+amp foram compostas de 16 g/L

de triptona, 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl, 100 mg/L de ampicilina, e 15 g/L de Bacto ágar.

[0166] Placas de seleção ura foram compostas de 6,7 g de nitrogênio base de levedura com sulfato de amônio, 5 g de casaminoácidos, 100 ml de ácido succínico a 0,5 M pH 5, 20 g de ágar Noble, e 855 ml de água desionizada. A seguir da esterilização em autoclave, 40 ml de glicose a 50% estéril e 2 ml de clorafenicol a 10 mg/ml foram adicionados e as placas vertidas.

[0167] Meios de seleção de ura foram compostos de 6,7 g de nitrogênio base de levedura com sulfato de amônio, 5 g de casaminoácidos, 100 ml de ácido succínico 0,5 M pH 5, e 855 ml de água desionizada. A seguir da esterilização em autoclave, 40 ml de glicose a 50% estéril e 2 ml de clorafenicol a 10 mg/ml foram adicionados.

[0168] Meios de YP+10% de glicose foram compostos de 500 ml de caldo YP e 100 ml de glicose a 50% estéril.

[0169] Caldo YP foi composto de 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona.

[0170] Placas YPD foram compostas de 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de bacto ágar, e água desionizada para 960 ml. A seguir da esterilização em autoclave, 40 ml de glicose a 50% estéril foram adicionados e as placas vertidas.

[0171] TAE foi composto de 4,84 g/L de Tris base, 1,14 ml/L de ácido acético glacial, e 2 ml/L de EDTA 0,5 M pH 8,0.

[0172] TBE foi composto de 10,8 g/L de Tris base, 5,5 g/L de ácido bórico, e 4 ml/L de EDTA a 0,5 M pH 8,0.

[0173] Solução de LiOAc/TE foi composta de 8 partes de água estéril, 1 parte de LiOAc 1 M, e 1 parte de 10X TE.

[0174] 10X TE (200 ml) foi composto de 2,42 g de Tris Base, 4 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0. HCl 5 M foi usado para ajustar o pH para 7,5 e a solução foi esterilizada pela autoclave.

[0175] Solução de PEG/LiOAc/TE foi composta de 8 partes de PEG3350 a 50%, 1 parte de LiOAc 1 M, e 1 parte de 10X TE.

[0176] PEG3350 a 50% foi preparado pela adição de 100 g de PEG3350 a 150 ml de água e aquecendo e agitando até dissolvido. O volume foi depois levado até 200 ml com água e esterilizados por autoclave.

[0177] Placas ScD FOA foram compostas de 275 ml de meio líquido 2X-ScD 2X FOA e 275 ml de meio de placa 2X-ScD 2X FOA, fundido e esfriado a 65°C.

[0178] Meio líquido 2X-ScD 2X FOA foi composto de 6,66 g de nitrogênio base de levedura sem aminoácidos, 1,54 g de suplemento ura DO (Clontech, Mountain View, CA, USA), 20 g de dextrose, 50 mg de uracila, 2 mg de uridina, e 2 g de 5-FOA (ácido 5-fluoroorótico, monohidratado; Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canadá) e água até 1 L. A solução resultante foi filtrada para esterilizar.

[0179] O meio de placa 2X-ScD 2X FOA foi composto de 11 g de bacto ágar e 275 ml de água. A solução resultante foi autoclavada para esterilizar.

[0180] Meio DM2 foi composto de sulfato de amônio (5,0 g/L), sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,5 g/L), fosfato de potássio monobásico (3,0 g/L), solução de elemento traço (1 ml/L) e solução de vitamina (1 ml/L). Depois de dissolver todos os componentes do meio, o pH do meio foi ajustado até o pH inicial desejado usando uma base apropriada (por exemplo, KOH).

[0181] Solução de elemento traço foi composta de EDTA (15,0 g/L), sulfato de zinco hepta-hidratado (4,5 g/L), cloreto de manganês desidratado (1,0 g/L), cloreto de cobalto (II) hexa-hidratado (0,3 g/L), Sulfato de cobre (II) penta-hidratado (0,3 g/L), dissódio molibdênio desidratado (0,4 g/L), cloreto de cálcio desidratado (4,5 g/L), sulfato de ferro hepta-hidratado (3 g/L), ácido bórico (1,0 g/L), e iodeto de potássio (0,1 g/L).

[0182] Solução de Vitamina foi composta de biotina (D-; 0,05 g/L), pantotenato de cálcio (D+; 1 g/L), ácido nicotínico (5 g/L), mio-inositol (25 g/L), cloridreto de piridoxina (1 g/L), ácido p-aminobenzóico (0,2 g/L), e cloridreto de tiamina (1 g/L).

[0183] Placas DM1 X- α -gal foram compostas de sais DM1, 20 g/L de glicose, solução de elemento traço, solução de vitamina, 2 ml/L de X- α -gal (16 mg/ml), 20 g/L de ágar.

[0184] Solução de sal de DM1 foi composto de 2,28 g/L de ureia, 3 g/L de fosfato de potássio monobásico, e 0,5 g/L de sulfato de magnésio hepta-hidratado.

[0185] Tampão de Fosfato Butterfields foi composto de 1,25 ml/L de Solução de estoque (26,22 g/L de Di-hidrogeno Fosfato de Potássio e 7,78 g/L de Carbonato de Sódio) e 5 ml/L de uma solução de Cloreto de Magnésio (81,1 g/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$). A solução resultante foi autoclavada para esterilizar, e o pH ajustado a 7,2.

[0186] Meio de frasco agitado CNB1 foi composto de ureia (2,3 g/L), sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,5 g/L), fosfato de potássio monobásico (3,0 g/L), solução de elemento traço (1 ml/L) e solução de vitamina (1 ml/L), glicose (120,0 g/L), ácido 2-(N-Morfolino)etanossulfônico (MES) (97,6 g/L). Depois de dissolver todos os componentes do meio, o pH do meio foi ajustado a um pH inicial de 5,8 usando uma base apropriada (por exemplo, KOH).

Tabela 0: Sequências iniciadoras

Identificador	SEQ ID NO:	Sequência (5'-3')
0611166	152	TAAACGACGGCCAGTGAATTCCGCGGCGGCCGCGAGTCCATCGGTTCTCTGTCA
0611167	153	CATAAGAAAATCAAAGACAGAAGGCGCGCCTTTGCTAGCATTTTTGTGTTTTGCT GTGT
0611168	154	ACACAGCAAAACACAAAAATGCTAGCAAAGGCGCGCCTTCTGTCTTTGATTTCCTTATG
0611169	155	GGGGGAAAGAACTACCAATAGGCCTCCTTAATTCGGAGAAAATC
0611170	156	GATTTTCTCCGAATTAAGGAGGCCTATTGGTAGTTCTTTCCCC
0611171	157	AAAATAAACTAGTAAATAAATTAATTAATTATCTAGAGAGGGGGTTATAT
0611172	158	ATATAACCCCTCTCTAGATAATTAATTAATTTATTTTACTAGTTTATTTT
0611173	159	GACCATGATTACGCCAAGCTCCGCGGCGGCCGCCAGTCAAAACCTTCTCTC
0611174	160	TAAACGACGGCCAGTGAATTCCGCGGCGGCCGCTTTGAAGGAGCTTGCCA

0611175	161	CTATTCCTTCTCCTCAAATTGCTGTTTAAACGCGTTGAAGATCTATTCTCC
0611176	162	GGAGAATAGATCTTCAACGCGTTTAAACAGCAATTTGAGGAAGGAATAG
0611177	163	AATGTTTCATTTTACATTCAGATGTTAATTAAGGTCTAGATGTGTTTGTGTTG
0611178	164	CACACAAACAAACACATCTAGACCTTAATTAACATCTGAATGTAAAAATGAAC
0611179	165	GACCATGATTACGCCAAGCTCCGCGGCGGCCGCAATGCCAAGAGTTATGGG
0611184	166	GGCTACCCTATATATGGTGAGCG
0611185	167	GGGTCCAAGTTATCCAAGCAG
0611186	168	CCTTAATTAACCGTAAAGTTGTCTCAATG
0611189	169	CAGCAAAACACAAAATTCTAGAAAATTTAATTAACATCTGAATGTAAAAATG
0611191	346	CCTTAATTAATTATCCACGGAAGATATGATG
0611195	170	GTTTCATTTTACATTCAGATGTTAATTAATTTTCTAGAATTTTGTGTTTTGCT
0611196	171	GCTCTAGATAAAATGCCCTCTTATTCTGTGCG
0611199	347	GCTCTAGATAAAATGTCCCAAGGTAGAAAAAGC
0611225	172	GACTGGATCATTATGACTCC
0611245	272	CGAACCAATTCAAGAAAACCAAC
0611250	173	ACGCCTTGCCAAATGCGGCGCGAGTCCATCGGTTCTCTGTCAGA
0611251	174	TCAAAGACAGAATTAATTAAGCTCTAGAATTTTGTGTTTGTGTTGTT
0611252	175	AACACAAAAATTCTAGAGCTTAATTAATTCTGTCTTTGATTTTCTTATG
0611253	176	GTTTAAACCTTTAATTCGGAGAAAATCTGATC
0611254	177	GTTAACGGTACCGAGCTTAAGTAGTGGTG
0611255	178	AACCGATGGACTCGCGGCCGCATTGGCAAGGCGTATCTAT
0611256	179	GGCGCCAGCAATTTGAGGAAGGAATAGGAG
0611257	180	AAACTATTAGATTAAATTAAGCTCGCGATGTGTTTGTGTTTGTGTTG
0611258	181	CAAACAAACACATCGCGAGCTTAATTAATCTAATAGTTTAAATCACAGCTTAT
0611259	182	TACATTATGGTAGCGGCCGCGTGTGACATTTTGTATCCACTCG
0611260	183	TGGATCAAAATGTCACACGCGCGCTACCATAATGTATGCGTTGAG
0611261	184	GGGCCCTAAAAGTGTGGTGTATTAGA
0611263	185	GCTAGCTCAACAACTCTTATCAGATTTAGCA
0611264	186	GCTAGCGAGGAAAAGAAGTCTAACCTTGT
0611266	187	TCGCGATAAAATGTCAACTGTGGAAGATCACTCCT
0611267	188	TTAATTAAGCTGCTGGCGCTTCATCTT
0611268	189	TCGCGATAAAATGTCCAGAGGCTTCTTTACTG
0611269	190	TTAATTAACCTAAAGGTCTCTCACGACAGAG
0611283	191	GTTAACCCGGTTTAAACATAGCCTCATGAAATCAGCCATT
0611284	192	GGGCCCATATGGCGCCCGGGCGTTGAAGATCTATTCTCCAGCA
0611295	193	GTTTAAACGATTGGTAGTTCTTTCCCTC
0611296	194	AATAAATTAAGGGCCCTTATCGCGAGAGGGGGTTATATGTGTAAA
0611297	195	TATAACCCCTCTCGCGATAAAGGGCCCTTAATTTATTTTACTAGTTTAT
0611298	196	GTTTAAACTTTGTAGCACCTCCTGGT
0611376	197	CAGCAAAACACAAAAAGCTAGCTAAAATGTTACGTACCATGTTCAAAA
0611377	198	GAAAATCAAAGACAGAAGGCGCGCTTATGCTGTAACAGCCTGCGG
0611378	199	CAGCAAAACACAAAAAGCTAGC TAAA ATGTTAAGAACCATGTTCAAATC
0611379	200	GAAAATCAAAGACAGAAGGCGCGCC TTATGCAGTAACAGCTTGTGGG
0611552	273	TCTGTCCCTTGGCGACGC
0611553	274	CTTTTCAAACAGATAAGTACC
0611554	201	GCATGGTGGTGCAAGCGACG
0611555	202	GGTGCTGCATTTGCTGCTG
0611622	275	ATGGGCTGACCTGAAAATTC
0611631	203	TGTATACAGGATCGAAGAATAGAAG
0611632	204	GAACGTCTACAACGAGGTGAAC
0611661	205	GGCGCGCCTCGCGATAAAATG
0611662	206	AGGGCCCTTAATTAATTATGCAGTAACAGCTT
0611717	207	CGCTACGATACGCTACGATA
0611718	208	CTCCCTTCCCTGATAGAAGG
0611814	209	GGGGAGCAATTTGCCACCAGG
0611815	210	CTCCTTCATTTAACTATACCAGACG
0611816	211	GACAGATGTAAGGACCAATAGTGTCC
0611817	212	CCATATCGAAATCTAGCCCGTCC
0611828	213	CATAAGAAAATCAAAGACAGAAGGCGCGCCTTGTAGCTTTTGTGTTTTG
0611954	348	GCTAGCTAAAATGTTTGGTAATATTTCCCA

0611957	349	TTAATTAACTATTTATCTAATGATCCTC
0611997	350	TCTAGATAAAATGTCTATTAGTGAAAAATATTTTCTCAAG
0611998	351	TTAATTAACTTTTAAATTTTGGAAAAAGCTTGATCAATAATGG
0612055	214	ATTGGACACAACATTATAT
0612150	238	ACGCGTCTGACTCGACATTGCTGCAACGGC
0612151	239	CTAGTCTAGATGTTGTTGTTGTTGTCGTT
0612271	215	GTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTTAACATAGGCTCCAACATCTCG
0612272	216	GGAACCGATGGACTCGCGGCCGC GTGGGATATTGGAAG
0612273	217	GGAGGTGCTACAAAAGGAATTC
0612274	218	GACCATGATTACGCCAAGCTCCGCGGAGTCAAAACCTTCTTCTTACC
0612275	219	GTAAAACGACGGCCAGTGAATTC TTTGAAGGAGCTTGCCAAGAAAC
0612276	220	CCTATTCCTTCTCAAATTGCTG
0612277	221	ATAACTCTTGGCATTGCGGCCGCCAAGTTAGTTAGAGC
0612278	222	ATGACCATGATTACGCCAAGCTCCGCGGCAAGACGGTGTATTAGTGCTTG
0612356	223	CACAAAACACACAAACAAACACAGCTAGCAAAGGCGGCCATCTAATAGTT TAATCACAGCTTA
0612357	224	GCCGTTGCAGCAAATGTCGAGGCCCTGTGTGACATTTTGATCCACTCG
0612358	225	CGAGTGGATCAAATGTACACAGGCCTCGACATTTGCTGCAACGGC
0612359	226	CATTTTACATTCAGATGTTAATTAATTATCTAGATGTTGTTGTTGTTGTCG
0612360	227	CGACAACAACAACAACATCTAGATAATTAATTAACATCTGAATGTAAATG
0612361	228	GCTCTAACTAACTTGGCGGCCGCTTTTATTATAAAATTATATATTATCTT
0612366	276	GCTGAAAATATCATTACAGCAT
0612367	277	ACTGTTGATGTCGATGCC
0612378	229	AACACACAAACAAACACAGCTAGCTAAAATGTTAAGAACTATGTTTA
0612379	230	GATTAACTATTAGATGGCGCGCCTTATGCAGTAACTGCTGTGGA
0612470	231	CGACGGCCAGTGAATTCGTTAACCCGTTTCGATGGGATTCCC
0612471	232	CAGGAACCGATGGACTCGCGGCCGCTCCCTTCTCTAAATGGACTGC
0612472	233	TATATAATTTTATAATAAAAGCGGCCGCACCAGGGGTTTAGTGAAGTC
0612473	234	CATGATTACGCCAAGCTCCGCGGCCATAACTGACATTTATGGTAAGG
0612579	278	TCTGAATGCAGTACGAGTTG
0612695	240	CAAAACACAGCAAAACACAAAAAGCTAGCATGTATAGAACCTTGATGAG
0612698	242	CAAAACACACAAACAAACACAGCTAGCATGTACAGAACGTTAATGTCTGC
0612724	241	CAAAGACAGAAGGCGCGCCTTATAAGATGGTTCTCGCTGG
0612725	243	GTGATTAACTATTAGATGGCGCGCCTTACAGGATGGTTCTGGCAGG
0612794	279	GAAGGGGGTCCAAGTTATCC
0612795	235	CCAACAATCTTAATTGGTGAC
0612891	236	GGCTGTTACCGCCTAATTAA
0612893	237	GTTCTTAACATTTTAGCTAGCTG
0612908	280	GATATGGGCGGTAGAGAAGA
0612909	281	GCTCCTTCAAAGGCAACACA
0612910	282	TGAACTATCACATGAACGTA
0612911	283	TCAAGGTAGGGTCACTAAC
0613034	284	TGATTCTTCAATCACAGGT
0613035	285	AACCGACCTATCGAATGCCT
0613178	286	ACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCTTGGGGTTTACGCTTACAGCGTACT
0613179	287	TCAACGCCCGGGGGATCTGGATCCGCGGCCGCAAGAAATTCCTTTCTTTTC CCCTTTATA
0613180	288	AACCGATGGACTCCTCGAGGGATCCGCGGCCGCGCATAACAAAATTGTGCCT AACCCA
0613181	289	ACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCGGGAAAAGGAGAGAGAAAAGGA GA
0613183	290	TATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCTCCTACAGAAGTAGCACCAGCA CCA
0613184	291	GGAACCGATGGACTCCTCGAGGGATCCGCGGCCGCGAGCTACCGTGTAAT AAGAGTACC
0613185	292	TCTTCAACGCCCGGGGGATCTGGATCCGCGGCCGCGATTGATATAAACGCT TCTATAATA
0613186	293	GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCAACATCTGCTGCTGTAATA TATTCA
0613241	294	GCATGTCTGTAACTCTCAAACCAT
0613242	295	TCCATAATCCAATAGATCATCCC
0613243	296	AACACAATGGAACCAACCTAGT
0613416	297	ATTTACACGGTAGTCTGCGGCCGCCATAGCCTCATGAAATCAGCC
0613417	298	CTCTAGGTTCACTGGTTGTTTCTTGGGCTGCCTCCTTCAA
0613418	299	TTGAAGGAGGCAGCCCAAGAAACAACCAAGTGAACCTAGAG
0613419	300	TATTATAGAAGCGTTTATATCAAATGCGGCCGCGGATCCAGATCCCCGGGG

		CGTT
0613550	301	AATGATCAACTTGAGAGGTA
0613551	302	CAGGTCTGTTACATAAAGCA
0613688	303	GTTTACGCTCAAATCTCCTCC
0613689	304	GGTACATGAAGCAGGCTTTGAAGG
0613695	305	GATTGTGTCCGTCAGCCTTTGCTC
0613746	306	TACCATATTTTCAGAGGATCA
0613747	307	AGGATGTTCTTGCTGCAAGT
0614233	308	GATGATATAGTTGATGCTTTCCAAAG
0614626	344	AGGGTACCTTAGTACGAAGG
0614627	345	CTATTCTTACGATGAAGGCG
CM647	262	AATGATCCATGGTCCGAGAG
oACN48	309	GGGCCCCCTTCATTTACGAAATAAAGTGCCGCGG
oACN49	310	GCGGCCGCAAATAAATTTAAATAAACGATATCAAAATTC
oACN50	311	CGACGCCAAAGAAGGGCTCAGCCGAAAAAG
oACN51	312	CCATTCTTTTTTCGGCTGAGCCCTTCTTTGGC
oACN52	313	GCGGCCGCAATAACCTCAGGGAGAACTTTGGC
oACN53	314	GAGCTCCCAAACAAGGTCTCAGTAGGATCG
oACN54	315	CGCCATAAGGAGAGGCTGTAGATTGTGTC
oACN55	316	CCAGGACATCTTGCTTGCAATGTGTC
oANN1	317	GTTCCATCGGGCCCCCTAAAGGTCTCTCACGACAG
oANN2	318	CAAAACACA TCGCGA TAAATGTCCAGAGGCTTC
oANN5	319	GCAAGACCTTGATCTGAAGGG
oANN6	320	CGAACCAATTCAAGAAAACCAACAG
oANN7	321	GGGCCC GTCCCTTGCGGACGCCCTGATC
oANN8	322	GCGGCCGCTATTTTGTGTTTTGCTGTGTTTTG
oANN9	323	GCGGCCGCC ATCTGAATGTAAATGAACATTAAAAATG
oANN10	324	GAGCTCCCCCAGTTGTTGTTGCAATTAAC
oANN11	325	GAAGAGACGTACAAGATCCGCC
oANN12	326	TAGGAATGGTGCATCATCCAAC
oANN13	327	TTCTTATCTGAAAACCTCCGAGTTTCGCAAAGAAGGTTGAAG
oANN14	328	TTATTGAAATTAATCCAAGGATTCAAGTTGAACATACAATTACTG
oANN15	329	TTTCCAAAAAAGTTCGTGAGTTCGATGGTTGTATGATTATGG
oANN16	330	CCTCTACCACCACCACCAAATG
oANN20	331	GGGAAGAACTAAGAAGAAGTATG
oCA405	260	GCAACTGATGTTACGAATGCG
oCA406	261	TTGCCGTTGCAGCAAAATCTC
oHJ1	332	CAATCCTTCTAGAGAGGGGTTATATGTGTAAATATAGAGTTTG
oHJ2	333	TTCTACCCTCGAGATTGGTTCTTTCCCCCTCTCAAG
oHJJ116	334	GTGGTCAATCTAGAAAATATGACTGACAAAATCTCCCTAGGTAC
oHJJ117	335	CAATTTTGGAGCTGATTCCAAATCGTAAAC
oJLJ28	264	GCACCAAGAGCAGTTTCCCATCTATTG
oJLJ29	265	CCATATAGTTCTTTTCTAACATCAACATCACACTTC
oJLJ30	266	GGAGAATAGATCTTCAACGCTTTAATAAAGTAGTTTG
oJLJ31	267	CGTGTTGCGCAATAAAACCAATGAC
oJLJ43	336	CAAGAGTATCCCATCTGACAGGAACCGATGG
oJLJ44	337	GCTGGAGAATAGATCTTCAACGCCCGG
oJLJ45	338	CGGAGAAGGCGTATAAAAAGGACACGGAG
oJLJ46	339	GGATAAAAGTATTACATACGTACAGGATTGTGTATTAGTGTATTTCG
oJLJ57	340	CCTCCAGTGTTTTTCTCTCTGTCTCTTTGTTTTTTTTTC
oJY11	268	CCTCGAAGAGCTTGAATTTG
oJY12	269	GTAGTGAATGTCCGGATAAG
oJY13	270	GCAAGGTCATGAGGTTAAAG
oJY14	271	AACACTTATGGCGTCTCCTC
oJY44	341	GGTTAATTAATTTATTGTACATAAAAACCATATAAATGTAAAAGC
oJY45	342	GAATTCCTTTAATTCGGAGAAAAATCTGATCAAGAG
WG26	263	ACGGCAGTATACCCTATCAGG

Sequências Misturadas

[0187] Promotores: Os promotores PDC, TDH3, ENO1, e PGK1 descritos nos Exemplos foram derivados das sequências de *I. orientalis*

das SEQ ID NOs: 244, 245, 246, e 247, respectivamente. Terminadores: Os terminadores TAL, TKL, RKI, e PDC descritos nos Exemplos foram derivados das sequências de *I. orientalis* das SEQ ID NOs: 248, 249, 250, e 251, respectivamente. O promotor *ura3*, ORF, e terminador descritos nos Exemplos foram derivados da sequência de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 252.

Exemplo 1A: Seleção de células hospedeiras de levedura com base na tolerância ao 3-HP

[0188] Um conjunto de cepas de levedura do tipo selvagem foi testado quanto a sua capacidade para crescer na presença de 3-HP.

[0189] A faixa de concentrações de 3-HP para utilizar nos procedimentos de triagem primária foi determinada pela avaliação da capacidade de sete cepas de levedura do tipo selvagem (Tabela 1, conjunto A) para crescer em meios contendo níveis variáveis de 3-HP. O 3-HP usado nestes experimentos foi quimicamente sintetizado a partir de uma solução de ácido acrílico aquoso (30%) e um catalisador de CO₂ a 200 psi (1380 kPa) e 175°C como descrito na WO04/076398. Ácido acrílico residual foi removido usando uma extração em contracorrente com éter isopropílico na temperatura ambiente (ver a WO05/021470).

[0190] As células foram riscadas em placas YPD e cultivadas durante a noite. Uma pasta fluida de célula com uma OD₆₀₀ em torno de 4 foi fabricada em meio YPD, pH 3,0, e esta pasta fluida foi usada para inocular reservatórios de microtituladora contendo várias concentrações de 3-HP (pH 3,9) a uma OD₆₀₀ de 0,05. As placas foram cobertas com uma membrana permeável a gás e incubadas em um agitador a 30°C/300 RPM durante a noite. As densidades ópticas para cada reservatório foram medidas em um comprimento de onda de 600 nm em uma leitora de placa modelo GENios (Tecan), e as placas foram observadas visualmente quanto ao crescimento. a concentração 3-HP mais alta que uma ou mais das cepas cresceram em (125 g/L) foi escolhida como a faixa superior para o procedimento de triagem primária.

Triagem Primária

[0191] Para o procedimento de triagem primária, 89 cepas de levedura do tipo selvagem foram triadas quanto ao crescimento em placas microtituladoras a 0 g/L, 75 g/L, 100 g/L, ou 125 g/L de 3-HP (pH 3,9) usando o mesmo protocolo usado para encontrar a faixa. Uma placa de YPD fresca foi usada para cada cepa, e uma pasta fluida com uma OD₆₀₀ em torno de 4 foi fabricada em meio YPD, pH 3,0. A pasta fluida foi usada para inocular cada reservatório a uma OD₆₀₀ de 0,05. As placas foram cobertas com uma membrana permeável a gás, e incubadas em um agitador a 30°C/300 RPM durante a noite. As densidades ópticas para cada reservatório foram medidas em um comprimento de onda de 600 nm em uma leitora de placa modelo GENios, e as placas foram observadas visualmente quanto ao crescimento. um protocolo similar foi conduzido para avaliar o crescimento nas concentrações de ácido láctico de 0 g/L, 30 g/L, 45 g/L, e 60 g/L. A Tabela 1 resume a concentração mais alta de 3-HP ou ácido láctico na qual o crescimento foi observado.

[0192] Quinze cepas foram identificadas que foram capazes de crescer a 100 g/L de 3-HP ou crescer bem a 75 g/L de 3-HP (Tabela 1, conjunto B). Para estreitar ainda mais as cepas, um teste de placa microtituladora secundária foi conduzido. Este teste foi similar ao primeiro, mas utilizou concentrações de 3-HP de 100 g/L, 112,5 g/L, e 125 g/L (pH 3,9). A partir deste teste, onze cepas foram identificadas (Tabela 1, conjunto C) que cresceram bem a 75 g/L de 3-HP ou mostraram algum crescimento tanto a 75 quanto a 112,5 g/L de 3-HP. Estas onze cepas foram avançaram para a triagem secundária. Quatro cepas que tiveram crescimento insuficiente a 75 g/L de 3-HP e nenhum crescimento a 112,5 g/L de 3-HP não foram avançadas para a triagem secundária. É esperado que as cepas que não avançam para a triagem secundária exibiriam desempenho economicamente inferior em um processo de fermentação comercial. Entretanto, é possível que uma ou mais de tais cepas não obstante possam atingir as exigências mínimas

para um processo de fermentação comercialmente viável.

Tabela 1: Crescimento em 3-HP ou ácido láctico

Cepa de Levedura	Coleção de Cultura #	Conju nto	Triagem primária: 3-HP (g/l)	Triagem primária: ácido láctico (g/l)
<i>Bulleromyces albus</i>	ATCC 96272		nenhum crescimento a 0 g/l (NG)	NG
<i>Candida blankii</i>	ATCC 18735		0	30
<i>Candida boidinii</i>	PYCC 70-104		0	30
<i>Candida catenulata</i>	ATCC 20117		0	NG
<i>Candida etchellsii</i>	PYCC 60-8		0	30
<i>Candida famata</i>	ATCC 20284		0	0
<i>Candida fluvialis</i>	ATCC 38623		0	0
<i>Candida geochares</i>	Cargill 1978		75	60
<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC 20118		0	0
<i>Candida intermedia</i>	ATCC 20178		0	0
<i>Candida kefyr</i>	ATCC 44691		75	30
<i>Candida lactiscondensi</i>	ATCC 96927		0	NG
<i>Candida lambica</i>	ATCC 38617	B, C	75	45
<i>Candida methanosorbosa</i>	ATCC 20361		0	NG
<i>Candida milleri</i>	ATCC 60591		0	30
<i>Candida milleri</i>	ATCC 60592		0	45
<i>Candida naeodendra</i>	ATCC 56465		0	NG
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 20179		0	0
<i>Candida pignaliae</i>	ATCC 36592		0	NG
<i>Candida pseudolambica</i>	ATCC 96309		0	0
<i>Candida rugosa</i>	ATCC 20306		0	45
<i>Candida shehatae</i>	NCYC 2389		0	0
<i>Candida sonorensis</i>	ATCC 32109	A	0	30
<i>Candida sorbophila</i>	Cargill 1973		75	45
<i>Candida sorboxylosa</i>	ATCC 24120		0	30
<i>Candida sorosivorans</i>	ATCC 38619	B	100	60
<i>Candida tenuis</i>	MUCL 47216 ou MUCL 31253B		0	NG
<i>Candida valida</i>	ATCC 28525	B	75	45
<i>Candida vanderwaltii</i>	MUCL 300000		0	45
<i>Candida zemplinina</i>	PYCC 04-501	A,B,C	100	60
<i>Candida zeylanoides</i>	ATCC 20347		75	45
<i>Citeromyces matritensis</i>	ATCC 34087		0	NG

<i>Debaryomyces castellii</i>	PYCC 70-1022		0	30
<i>Debaryomyces hansenii</i>	ATCC 90624		0	NG
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	ATCC 20280		0	0
<i>Dekkera anomala</i>	ATCC 20277		0	0
<i>Dekkera lambica</i>	ATCC 10563		0	0
<i>Hyphopichia burtonii</i>	ATCC 20030		0	0
<i>Issatchenkia orientalis</i>	ATCC 24210	B, C	100	45
<i>Issatchenkia orientalis</i>	ATCC 60585	B, C	100	45
<i>Issatchenkia orientalis</i>	ATCC PTA-6658	A,B,C	100	60
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CD1822 (coleta Cargill – ver descrição abaixo)	A,B,C	100	60
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ATCC 8585	A	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	ATCC 52486	A	75	45
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	ATCC 52709		0	30
<i>Kodamaea ohmeri</i>	ATCC 20282		0	45
<i>Kluyveromyces yarrowii</i>	ATCC 36591		NG	NG
<i>Lipomyces starkeyi</i>	ATCC 12659		0	0
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	ATCC 56306		NG	NG
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	ATCC 9889		0	0
<i>Myxozyma kluyveri</i>	ATCC 76214		NG	NG
<i>Nematospora coryli</i>	ATCC 20292		0	NG
<i>Pachysolen tannophilus</i>	NCYC 614		0	30
<i>Pichia anomala</i>	ATCC 2102		0	0
<i>Pichia fermentans</i>	ATCC 28526		0	30
<i>Pichia fluxuum</i>	ATCC 28778		NG	NG
<i>Pichia jadinii</i>	ATCC 9950		0	0
<i>Pichia membranifaciens</i>	NCYC 2696	B,C	125	60
<i>Pichia nakasei</i>	ATCC 24116		0	0
<i>Pichia silvicola</i>	ATCC 16768		0	0
<i>Pichia stipitis</i>	CBS 6054		0	0
<i>Pichia strasburgensis</i>	ATCC 34024		0	0
<i>Pichia tannicola</i>	ATCC 2261		0	0
<i>Pichia toletana</i>	ATCC 58362		NG	NG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 96784		75	30
<i>Saccharomyces bayanus</i>	ATCC 90739		0	45
<i>Saccharomyces bulderi</i>	MYA-402	B, C	100	60
<i>Saccharomyces bulderi</i>	MYA-404	B,C	100	45
<i>Saccharomyces capsularis</i>	ATCC 20033		0	0
<i>Saccharomyces</i>	CEN-PK 113-7D	A,B	100	45

<i>cerevisiae</i>				
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	NCYC 734		75	45
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	MUCL 44417		0	0
<i>Saccharomycopsis javensis</i>	MUCL 31237		0	45
<i>Saccharomycopsis vini</i>	NRRL Y-7290		0	0
<i>Saccharomyces uvarum</i>	ATCC 76514		0	0
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	ATCC 10660		0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NCYC 535	B,C	100	60
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	ATCC 52714		75	0
<i>Torulaspora pretoriensis</i>	ATCC 42479	B	75	0
<i>Wickerhamiella occidentalis</i>	CBS 8452		0	30
<i>Yamadazyma guilliermondii</i>	ATCC 90197		0	0
<i>Yamadazyma haplophila</i>	ATCC 20321		0	0
<i>Yamadazyma stipitis</i>	ATCC 201225		0	0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	ATCC 46330		0	45
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ATCC 36946		75	45
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	NCYC 3134		0	45
<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	NCYC2897		0	60
<i>Zygosaccharomyces lentus</i>	NCYC 2928	B,C	100	45
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ATCC 34890		75	30

[0193] A cepa CD1822 de *I. orientalis* testada acima foi gerada pelo desenvolvimento de ATCC PTA-6658 de *I. orientalis* por 91 dias em um quimiostato limitado em glicose. O sistema foi alimentado com 15 g/L de dextrose em um meio DM, e operado em uma taxa de diluição de $0,06 \text{ h}^{-1}$ no $\text{pH} = 3$ com ácido láctico adicionado no meio de alimentação. As condições foram mantidas com uma taxa de transferência de oxigênio baixa de aproximadamente $2 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$, e a concentração de oxigênio dissolvido permaneceu constante a 0% de saturação de ar. Isolados de colônia única do ponto de tempo final foram caracterizados em dois ensaios de frasco agitado. No primeiro ensaio, as cepas foram caracterizadas quanto a sua capacidade para fermentar glicose para etanol na presença de 25 g/L de ácido láctico total sem nenhum ajuste de pH no meio definido de DM1. No segundo ensaio, a

taxa de crescimento dos isolados foi medida na presença de 25, 32 e 45 g/L de ácido láctico total, sem nenhum ajuste de pH em meio definido de DM1. A cepa CD1822 foi um isolado único selecionado com base nas taxas de fermentação e taxas de crescimento medidas. Outros métodos para a *I. orientalis* em desenvolvimento incluem, mas não são limitados a, subcultura serial repetida sob condições seletivas como descrito, por exemplo, na Patente U.S. No. 7.629.162. Tais métodos podem ser usados no lugar, ou além do uso do método do quimiostato limitado em glicose descrito acima. Como pode ser avaliado por uma pessoa versada na técnica, as cepas podem ser geradas usando um procedimento de evolução similar na presença de 3-HP adicionado ao invés do ácido láctico para desenvolver tolerância ao 3-HP melhorada. Adicionalmente, as cepas podem ser mutagenizadas antes da seleção, como aqui descrito (por exemplo, ver o Exemplo 1B).

Triagem Secundária

[0194] Para a primeira parte da triagem secundária, as taxas de crescimento foram medidas no pH 3,9 em meio YPD contendo 0 g/L, 35 g/L, ou 75 g/L de 3-HP. Frascos agitados foram inoculados com biomassa colhida dos frascos de semente cultivados durante a noite até uma OD₆₀₀ de 6 a 10. Frascos de taxa de crescimento provido de septo de 250 ml (volume de trabalho de 50 ml) foram inoculados até uma OD₆₀₀ de 0,1 e cultivados a 250 rpm e 30°C. Amostras foram tiradas por todo o curso de tempo do ensaio e analisadas quanto ao crescimento da biomassa por intermédio da OD₆₀₀. Os dados de OD₆₀₀ resultantes foram plotados e as taxas de crescimento foram estabelecidas.

Tabela 2: Taxa de Crescimento (μ) em 3-HP

Cepa	0 g/L 3-HP	35 g/L 3-HP	75 g/L 3-HP
<i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 60585	0,56	0,51	0,29
<i>Issatchenkia orientalis</i> CD1822	0,62	0,52	0,28
<i>Candida lambica</i> ATCC 38617	0,65	0,53	0,30
<i>Candida valida</i>	0,51	0,32	0,14
<i>Issatchenkia orientalis</i> PTA-6658	0,61	0,53	0,32
<i>Issatchenkia orientalis</i> 24210	0,58	0,51	0,26
<i>Saccharomyces bulderi</i> MYA 402	0,53	0,45	0,28
<i>Pichia membranifaciens</i>	0,41	0,39	0,32
<i>Saccharomyces bulderi</i> MYA 404	0,55	0,44	0,27
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0,41	0,35	0,21
<i>Zygosaccharomyces lentus</i>	0,61	0,41	0,20

[0195] Para a segunda parte da triagem secundária, o consumo de glicose foi medido para as mesmas dez cepas no pH 3,9 em meio YPD contendo 100 g/L de glicose e 0 g/L, 35 g/L, ou 75 g/L de 3-HP. Frascos agitados foram inoculados com biomassa colhida de frascos de semente cultivados durante a noite a uma OD₆₀₀ de 6 a 10. Frascos de ensaio glicolítico de 250 ml providos de septo (volume de trabalho de 50 ml) foram inoculados a uma OD₆₀₀ de 0,1 e cultivados a 250 RPM e 30°C. Amostras foram tiradas por todo o curso de tempo do ensaio e analisadas quanto ao consumo de glicose usando um Analisador Bioquímico 2700 da Yellow Springs Instruments (YSI). Os dados resultantes foram plotados e as taxas de consumo de glicose foram estabelecidas.

Tabela 3: Taxa de Consumo de Glicose (g/L/h) em 3-HP

Cepa	0 g/L 3-HP	35 g/L 3-HP	75 g/L 3-HP
<i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 60585	5,5	4,2	3,3
<i>Issatchenkia orientalis</i> CD1822	5,5	4,2	4,2
<i>Candida lambica</i> ATCC 38617	4,2	4,2	3,5
<i>Candida valida</i>	5,5	2,2	2,1
<i>Issatchenkia orientalis</i> PTA-6658	5,5	4,2	4,1
<i>Issatchenkia orientalis</i> 24210	4,2	4,2	3,8
<i>Saccharomyces bulderi</i> MYA 402	4,2	4,2	4,0
<i>Pichia membranifaciens</i>	0,4	2,1	1,2
<i>Saccharomyces bulderi</i> MYA 404	4,2	4,2	3,8
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,5	3,1	2,0
<i>Zygosaccharomyces lentus</i>	3,4	0,8	0,3

[0196] Quatro das cepas (*P. membranifaciens*, *S. pombe*, *C. valida*, e *Z. lentus*) não obtiveram a taxa de utilização de glicose de 2,5 g/L/h nas condições abaixo dos 75 g/L de 3-HP (pH 3,9) que seriam requeridas para

um processo de fermentação econômico.

[0197] Para identificar as cepas principais em 3-HP, o desempenho de cepa foi classificado em três categorias. Duas destas categorias foram com base em aspectos diferentes da taxa de crescimento: 1) taxa de crescimento na concentração de ácido mais alta e 2) inclinação das taxas de crescimento plotadas contra a concentração de ácido. A terceira categoria foi a taxa glicolítica na concentração de ácido mais alta. Esta classificação foi feita em uma escala normalizada usando os valores mais alto e mais baixo para cada avaliação como os limites normalizados. Cada cepa assim recebeu um grau entre 0 e 1 para cada categoria, com 1 sendo a contagem mais alta possível. A avaliação global de uma cepa foi a soma do valores normalizados para as três categorias. Uma contagem ponderada foi feita em que a taxa de crescimento e a taxa glicolítica foram igualmente ponderadas. Neste caso a taxa glicolítica na concentração de ácido mais alta foi ponderada a 50%, enquanto que as duas avaliações de taxa de crescimento foram ponderadas a 25% cada uma. Os valores normalizados por categoria e a soma e contagens ponderadas são resumidas na Tabela 4.

Tabela 4: Graus de Cepa em 3-HP

Cepa	Taxa de Crescimento a 75 g/l de 3-HP	Inclinação da Taxa de Crescimento	taxa glicolítica	contagem de soma	contagem ponderada
<i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC PTA-6658	1,00	0,37	0,97	2,34	0,83
<i>Saccharomyces bulderi</i> MYA 402	0,78	0,49	0,94	2,21	0,79
<i>Issatchenkia orientalis</i> CD1822	0,78	0,21	1,00	1,99	0,75
<i>Saccharomyces bulderi</i> MYA 404	0,72	0,42	0,90	2,04	0,74
<i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 60585	0,83	0,44	0,77	2,04	0,70
<i>Issatchenkia orientalis</i> 24210	0,67	0,28	0,90	1,85	0,69
<i>Candida lambica</i> ATCC 38617	0,89	0,19	0,82	1,90	0,68
<i>Pichia membranifaciens</i>	1,00	1,00	0,23	2,23	0,62

<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0,39	0,65	0,47	1,51	0,50
<i>Candida valida</i>	0	0,14	0,40	0,54	0,24
<i>Zygosaccharomyces lentus</i>	0,33	0	0	0,33	0,08

[0198] Das cepas testadas, as cepas da espécie *I. orientalis*, *C. lambica*, e *S. bulderi* mostraram o maior potencial como hospedeiros de produção para 3-HP em pH baixo.

[0199] Os mesmos procedimentos foram utilizados para triar, avaliar, e classificar as 91 cepas de levedura do tipo selvagem originais da triagem primária com meios contendo 0, 25, e 50 g/L de ácido láctico no pH 2,85 (~80% de ácido livre). Os valores normalizados e as contagens ponderadas e somadas foram derivadas para 13 cepas que foram avançadas para a triagem secundária.

Tabela 5: Graus de cepa em ácido láctico

Cepa	Taxa de Crescimento a 50 g/l de ácido láctico	Inclinação da Taxa de Crescimento	taxa glicolítica	contagem de soma	contagem ponderada
<i>Candida lambica</i> ATCC 38617	0,92	1,00	1,00	2,92	0,98
<i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC PTA-6658	0,94	0,95	1,00	2,89	0,97
<i>Issatchenkia orientalis</i> CD1822	1,00	0,86	1,00	2,86	0,97
<i>Issatchenkia orientalis</i> 24210	0,89	0,73	1,00	2,62	0,91
<i>Candida zemplinina</i>	0,22	0,95	1,00	2,17	0,79
<i>Saccharomyces bulderi</i> MYA 404	0,47	0,45	1,00	1,92	0,73
<i>Saccharomyces bayanus</i>	0,08	0,91	0,96	1,95	0,73
<i>Saccharomyces bulderi</i> MYA 402	0,50	0,23	1,00	1,73	0,68
<i>Candida milleri</i>	0	0,64	0,92	1,56	0,62
<i>Candida sorosivorans</i>	0,28	0,95	0,59	1,82	0,60
<i>Kodamaea ohmeri</i>	0,42	0	0,76	1,18	0,49
<i>Candida geochares</i>	0,17	0,27	0,69	1,13	0,46
<i>Saccharomyces javensis</i>	0,11	0,68	0	0,79	0,20

[0200] Para o ácido láctico apenas *S. javensis* não alcançou a taxa de utilização de glicose de 2,5 g/L/h no pH 2,85 em média com 50 g/L

de ácido láctico. Embora *I. orientalis*, *C. lambica*, e *S. bulderi* mostrassem tolerância ao ácido tanto para 3-HP quanto para o ácido láctico, houve várias cepas que foram tolerantes para apenas um dos ácidos. Isto também pode ser observado nos resultados da triagem primária (Tabela 1). Por exemplo, *C. milleri*, *C. rugosa*, *C. vanderwaltii*, *K. ohmeri*, *S. bayanus*, *S. javensis*, *Y. lipolitica*, *Z. bisporus*, e *Z. kombuchaensis* todas demonstraram crescimento em 45 a 60 g/L de ácido láctico, mas nenhum crescimento mesmo na concentração mais baixa de 3-HP testada (35 g/L). Assim, a tolerância de uma cepa a um ácido orgânico não pode ser definitivamente usada como um prognosticador da sua tolerância para outros ácidos. Isto é salientado ainda pela comparação das cepas que mostraram resistência a 3-HP acima com a lista de oito cepas identificadas como hospedeiros preferidos para a produção de ácido orgânico na WO03/049525. Embora duas destas cepas (*C. diddensiae* e *C. entomophila*) não puderam ser obtidas para testar, as outras seis foram incluídas na triagem primária descrita acima. Destas seis, apenas *C. krusei* (testada como *I. orientalis*) foi capaz de crescer na presença de 35 g/L de 3-HP.

Exemplo 1B: Mutagênese e seleção de cepas mutantes tendo resistência para 3-HP

[0201] As células de levedura selecionadas no Exemplo 1A são submetidas à mutagênese e expostas à pressão de seleção de modo a identificar mutantes com alta tolerância a 3-HP.

[0202] Por exemplo, as células de levedura de uma placa YP fresca com (extrato de levedura/peptona) + 20 g/L de glicose ou cultura líquida (OD₆₀₀ 1-4) são recolocadas em suspensão em água estéril a uma OD₆₀₀ em torno de 10. Alíquotas de 200 µL desta suspensão de célula são pipetadas em tubos individuais e expostas a 3 µL de sulfonato de etano metila (EMS) por aproximadamente uma hora, o que mata em torno de 65% das células. Concentrações de EMS mais altas também podem ser usadas para aumentar a taxa de morte. Depois da exposição, as células são neutralizadas

com 5% de tiosulfato de sódio, lavadas em tampão de PBS, recuperadas em meio rico por aproximadamente quatro horas, e cultivadas em meio seletivo. As amostras simuladas (nenhum EMS) são também conduzidas para garantir que as condições sejam seletivas. Alternativamente, as células podem ser mutagenizadas usando irradiação de UV.

[0203] Para selecionar quanto a cepas mutantes resistentes a 3-HP, alíquotas da suspensão de célula tratada com EMS (aproximadamente 2×10^8 de células mutagenizadas) são plaqueadas em um ágar de dextrose de batata (PDA) ou outro meio contendo 3-HP em um nível no qual a cepa precursora não cresce ou cresce muito lentamente. Estas placas são incubadas por vários dias até que as colônias apareçam. Colônias únicas são purificadas, riscadas em meio não seletivo para eliminar qualquer um dos efeitos adaptativos da seleção, e retestadas em meio seletivo para confirmar a resistência aumentada. As cepas resistentes são depois testadas em um formato de frasco agitado com amostragem periódica para análise de HPLC de produtos e substratos. Alternativamente, a seleção quanto à tolerância ao 3-HP pode ser feita pelo quimiostato ou evolução em frasco agitado em série. Rodadas adicionais de mutagênese e seleção podem ser realizadas. A mutagênese pode ser usada para aumentar a resistência de um hospedeiro que não atinge nativamente as exigências de produção em 3-HP de modo que o mesmo tenha os atributos necessários para a produção comercial de 3-HP.

Exemplo 2A: Procedimento para a transformação de DNA dentro do genoma hospedeiro

[0204] A transformação de DNA dentro do genoma hospedeiro da levedura para gerar as cepas de levedura modificadas descritas nos exemplos que seguem foi conduzida com base no procedimento específico abaixo.

[0205] Quatro ml de meio YP+10% de glicose foram adicionados a um tubo Falcon de 14 ml e a cepa desejada foi inoculada neste

meio usando uma alça estéril. A cultura foi cultivada com agitação a 250 rpm durante a noite (~16 h) a 37°C. 1 ml da cultura durante a noite foi adicionado a um frasco provido com septo de 250 ml contendo 50 ml de meio YP+10% de glicose líquido. O frasco foi cultivado com agitação a 250 rpm a 37°C. Alíquotas pequenas da cultura foram retiradas em intervalos aproximadamente de hora em hora e a OD₆₀₀ foi medida. A cultura foi cultivada até que a OD₆₀₀ fosse de 0,6 a 1,0.

[0206] As células foram colhidas pela centrifugação a 2279 x g na temperatura ambiente, a pelota foi recolocada em suspensão em 25 ml de água estéril, depois centrifugada a 2279 x g na temperatura ambiente. A pelota foi recolocada em suspensão em 1 ml de água estéril, e as células recolocadas em suspensão foram transferidas para um tubo de 1,5 ml e depois pelletizadas a 16.100 x g. As células foram recolocadas em suspensão em 1 ml de solução de LiOAc/TE e depois pelletizadas a 16.100 x g. A pelota de célula foi depois recolocada em suspensão em 500 µL de solução de LiOAc/TE.

[0207] Os componentes que seguem foram adicionados a um tubo de 1,5 ml: 100 µL das células acima, 10 µL de DNA de esperma de salmão recém-fervido depois resfriado (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), e 10 µL do DNA transformador desejado, linearizado. Uma reação de controle com água ao invés de DNA também foi preparada. Para cada reação de transformação, 600 µL de solução de PEG/LiOAc/TE foram adicionados e a reação incubada no seu lado a 30°C em uma plataforma agitadora a 250 rpm por 30 minutos. 40 µL de DMSO e foram adicionados a cada reação e depois incubados em um banho de água a 42° C por 5 minutos. As células foram pelletizadas a 5,400 x g por 1 min. As células foram recolocadas em suspensão em água, dividida em duas, e cada metade da reação de transformação foi plaqueada em uma placa de meio de seleção ura. As placas foram colocadas a 37°C. As colônias foram no geral visíveis depois de 18 a 24 h de cultivo, dependendo do fundo da cepa.

[0208] Uma alça estéril foi usada para transferir uma quantidade pequena de levedura de uma placa de Petri para um tubo de 1,5 ml contendo 300 µL de Solução de lise de Levedura (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI, USA) e o DNA genômico foi extraído usando o Kit de Purificação de DNA de Levedura MasterPure® (EPICENTRE® Biotechnologies) de acordo com as instruções do fabricante.

[0209] O DNA genômico preparado usando o Kit de Purificação de DNA de Levedura MasterPure® (EPICENTRE® Biotechnologies) foi usado nas reações de PCR para determinar se o evento de integração correto ocorreu no transformante isolado. Uma reação de PCR (25 µL) conteve 0,5 µL de DNA genômico para a cepa a ser triada, Tampão de Reação 1X Crimson Taq® (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 25 pmol de cada um dos iniciadores de sentido e de antessentido, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 0,625 unidades de DNA polimerase Crimson Taq® (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® (Eppendorf Scientific, Westbury, Nova Iorque, USA) programado para um ciclo a 95°C por 30 segundos, seguido por 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, e 68°C por 1 minuto por kbp do produto maior, com uma extensão final a 68°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE ou TBE e os tamanhos das faixas visualizadas e interpretadas como para os conjuntos de iniciadores específicos como descrito.

Exemplo 2B: Seleção de sítios de inserção

[0210] Os sítios de inserção adequados para a incorporação de genes exógenos dentro das células de levedura hospedeiras podem ser locais para genes que têm efeitos benéficos ou neutros na produção de 3-HP quando deletados na célula hospedeira de levedura. Os exemplos não limitantes de sítios de inserção adequados para cepas de levedura selecionadas

são aqui descritos nos exemplos de trabalho. Uma pessoa habilitada na técnica pode facilmente aplicar as divulgações aqui para o uso destes e outros sítios de inserção, por exemplo, locais para um ou mais genes de PDC (por exemplo, gene de PDC de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 49 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 48), ADH (por exemplo, gene de ADH de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada nas SEQ ID NOs: 106, 108, ou 110 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada nas SEQ ID NOs: 105, 107, ou 109), GAL6 (por exemplo, gene GAL6 de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 112 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 111), CYB2A (por exemplo, gene CYB2A de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 114 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 113), CYB2B (por exemplo, gene CYB2B de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 116 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 115), GPD (por exemplo, gene de GPD de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 118 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 117), ALD (por exemplo, gene homólogo de ALD de *I. orientalis* 5680 que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 120 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 119, gene homólogo de ALD de *I. orientalis* 42026 que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 122 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 121, gene homólogo de ALD de *I. orientalis* 42426 que codifica a sequência de

aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 124 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 123, ou gene homólogo de ALD de *I. orientalis* 42727 que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 126 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 125), ou PCK (por exemplo, gene de PCK de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 128 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 127) ou seus homólogos. Onde as sequências para estes genes não são publicadas, elas podem ser obtidas usando procedimento padrão tal como sequenciamento de genoma, hibridização de sonda de bibliotecas genômicas ou de cDNA, ou amplificação de fragmentos de gene usando os iniciadores degenerados com base na sequência homóloga conhecida, seguido pelo andamento cromossômico para obter a sequência completa. Outros locais adequados para os sítios de inserção incluem regiões intergênicas que não contêm estruturas de leitura aberta.

Exemplo 2C: Técnicas para a inserção de vetores, cassetes de marcador de seleção, cassetes de expressão de gene, e construções de integração

[0211] Vetores de sítio de inserção são gerados para integrar um ou mais genes exógenos dentro de células hospedeiras de levedura. As células hospedeiras de levedura podem ser células que passaram por um processo de seleção como descrito no Exemplo 1, ou elas podem ser células que não sofreram mutagênese e/ou seleção.

[0212] Para gerar vetores de sítio de inserção, uma região a montante (5') e uma região a jusante (3') do sítio de inserção desejado são ambas amplificadas usando DNA genômico hospedeiro como padrão. A região a montante é preferivelmente maior do que 70 pares de base e menor do que 1,5 kbp. As sequências alvos resultantes são ligadas em um vetor de

clonagem simultânea ou sequencialmente para obter um vetor com uma cópia de cada fragmento de modo que os fragmentos sejam contíguos ou quase contíguos. Um único sítio de restrição pode ser incorporado entre os fragmentos para permitir a inserção do cassete de expressão de genes e/ou cassetes de marcador de seleção. Os sítios de enzima de restrição únicos também podem ser incorporados na ou próximo da extremidade 5' do fragmento a montante e na ou próximo da extremidade 3' do fragmento a jusante para permitir quanto à remoção posterior do DNA entre estes sítios do vetor de clonagem.

[0213] Cassetes de marcador de seleção para a incorporação em vetores de sítio de inserção são gerados usando técnicas de clonagem padrão. Estes cassetes de marcador de seleção contêm um gene para um marcador selecionável, e também podem conter um promotor a montante e/ou uma sequência terminadora a jusante. Os exemplos de genes marcadores de seleção adequados incluem os genes *URA3*, *TRP1*, *HIS*, *MEL5*, *CYB2A*, *LEU2*, e *G418*. As sequências flanqueadoras podem ser incorporadas dentro do cassete em cada lado do promotor/gene marcador/sequências terminadoras para permitir quanto à perda futura do marcador através da recombinação. Estas sequências flanqueadoras podem incluir uma sequência de repetição direta ou invertida (sequência funcional ou não funcional) ou um ou mais sítios *loxP*.

[0214] Cassetes de expressão de gene são gerados usando técnicas de clonagem padrão. Estes cassetes de expressão de gene contêm o gene a ser superexpresso, e também podem conter um promotor a montante e/ou uma sequência terminadora a jusante. Em certas formas de realização, duas ou mais cópias destas combinações de promotor/gene/terminador podem ser incorporadas em um único cassete de expressão de genes. Os genes heterólogos podem ser otimizados no códon para expressão melhorada na cepa de levedura hospedeira. Um cassete marcador de seleção como aqui descrito pode ser clonado dentro do cassete de expressão de gene tal que o

mesmo seja contíguo ou quase contíguo com o gene a ser superexpresso e qualquer promotor e/ou terminador associados.

[0215] Alternativamente, para a substituição de promotores nativos com um promotor exógeno, o cassete de expressão pode ter o cassete de seleção a montante do promotor a ser integrado, entre as sequências alvejadoras.

[0216] Os cassetes de expressão de gene podem ser inseridos entre as duas sequências de sítio alvo nos vetores de sítio de inserção aqui descritos usando técnicas de clonagem padrão para gerar construções de integração de expressão de gene. Um ou mais cassetes de marcador de seleção também podem ser inseridos entre as sequências alvos, como parte do cassete de expressão de gene ou separadamente. Em certas variações, pedaços do cassete de expressão de gene podem ser clonados em vetores de sítio de inserção diferentes de modo que haja uma sobreposição de fragmento em comum entre os fragmentos de integração. Por exemplo, um vetor poderia conter um fragmento de inserção, um promotor, um gene, e um terminador a montante e o segundo vetor poderia conter o terminador, cassete marcador de seleção, e fragmento de inserção a jusante. Em outro exemplo, para permitir a inserção simultânea de dois genes, um vetor poderia conter o fragmento de inserção, um promotor, um gene, terminador e todo ou parte de um cassete marcador de seleção a montante, e o segundo vetor poderia conter todo ou parte do cassete marcador de seleção, um segundo promotor, gene, terminador, e o fragmento de inserção a jusante.

[0217] Para gerar construções de batimento de gene, os vetores de sítio de inserção são fabricados usando sequências de DNA alvejadas derivadas das regiões flanqueadoras a montante e a jusante do gene a ser deletado ou rompido. As sequências alvos selecionadas podem incluir regiões flanqueadoras a montante e a jusante de um gene alvo e/ou toda ou uma porção da sequência codificadora do gene alvo ou seus elementos

reguladores (por exemplo, promotor ou terminador). Um ou mais cassetes de marcador de seleção podem ser incorporados dentro do vetor do sítio de inserção entre as duas sequências alvos. Onde o silenciamento deva ser emparelhado com a expressão de um gene exógeno, um ou mais cassetes de expressão de gene também são incorporados dentro do vetor de sítio de inserção.

[0218] Os fragmentos de DNA a serem integrados dentro de um genoma de levedura hospedeira podem ser linearizados pela digestão com enzima de restrição do fragmento de um vetor de clonagem, ou de fragmentos de sobreposição de vetores múltiplos. Alternativamente, fragmentos de integração linear podem ser gerados usando PCR, ou uma combinação de PCR e digestão com enzima de restrição. As regiões flanqueadoras de sítio de inserção podem ser incorporadas dentro do fragmento de integração pela sua presença no padrão de vetor ou pela incorporação dentro dos iniciadores de amplificação. No último caso, um mínimo de 70 nucleotídeos de uma região flanqueadora são preferivelmente incorporados dentro de um iniciador.

[0219] Exemplos não limitantes de vetores de inserção, cassetes de marcador de seleção, cassetes de expressão de gene, e construções de integração adequadas para as cepas de levedura selecionadas são descritos nos exemplos de trabalho que seguem. Uma pessoa habilitada na técnica pode facilmente aplicar as divulgações destes exemplos e do relatório descritivo precedente para gerar cepas de levedura modificadas alternativas que produzam 3-HP.

Exemplo 2D: Construção de vetor de inserção para expressar um gene exógeno no local adh1202

[0220] O plasmídeo pMIBa107 foi criado para permitir a integração de um único gene no local adh1202 da *I. orientalis* sob o controle do promotor e terminador PDC usando URA3 como um marcador selecionável. O promotor e terminador PDC com o marcador selecionável ura

foram amplificados pela PCR e clonados dentro do pCR4®4BLUNT TOPO® (Invitrogen, La Jolla, CA, USA) como descrito abaixo. o fragmento de PCR contendo o promotor, terminador PDC e o marcador selecionável URA3 foi construído pela SOE PCR. O promotor PDC foi amplificado com um iniciador que contém homologia com o terminador PDC na extremidade 3' do produto de PCR e o terminador PDC e o marcador selecionável URA3 foram amplificados usando um iniciador com homologia com o promotor PDC na extremidade 5' do produto. Estes dois fragmentos foram depois colocados juntos por intermédio da SOE PCR.

[0221] O promotor PDC foi amplificado a partir de pACN5 (Figura 19) usando os iniciadores 0611184 e 0611195. O iniciador 0611184 introduz um sítio de restrição *NotI* na extremidade 5' do produto de PCR. O iniciador 0611195 introduz um sítio de restrição *XbaI* depois do promotor PDC e introduz homologia ao terminador PDC na extremidade 3' do produto de PCR.

[0222] As reações de amplificação foram realizadas usando Platinum® *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação de PCR conteve 0,5 µL de pACN5 diluído (Figura 19), 25 pM de cada um dos iniciadores 0611184 e 0611195, 1X tampão de amplificação *Pfx* (Invitrogen), 2 mM de MgSO₄, 0,2 mM de mistura de dNTP, 1,25 Unidade de Platinum® *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 50 µL. As reações de amplificação foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para 1 ciclo a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 2 minutos; com uma extensão final a 72°C por 3 minutos.

[0223] O produto de PCR foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base de 89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Um fragmento de aproximadamente 700 pares de base foi excisado do gel e extraído da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen, Valencia, CA,

USA).

[0224] O terminador PDC e o marcador selecionável URA3 foram amplificados a partir de pHJJ76 (Figura 24) usando os iniciadores 0611189 e 0611185. O iniciador 0611189 introduz homologia ao promotor PDC na extremidade 5' do produto de PCR e um sítio de restrição *PacI* diretamente em frente do terminador PDC. O iniciador 0611185 introduz um sítio de restrição *NotI* na extremidade 3' do produto de PCR. As reações de amplificação foram realizadas usando a Platinum® *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação de PCR conteve 0,5 µL de pHJJ76 diluído, 25 pM de cada um dos iniciadores 0611189 e 0611185, 1X tampão de amplificação *Pfx* (Invitrogen), 2 mM de MgSO₄, 0,2 mM de mistura de dNTP, 1,25 Unidades de Platinum® *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 50 µL. As reações de amplificação foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado por 1 ciclo a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 2 minutos; com uma extensão final a 72°C por 3 minutos.

[0225] O produto de PCR foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Um fragmento de aproximadamente 2000 pares de base foi excisado do gel e extraído da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen).

[0226] O produto de PCR de terminador PDC e marcador selecionável URA3 de 2000 pares de base e o produto de PCR do promotor PDC de 700 pares de base foram fundidos usando SOE-PCR. As reações de amplificação foram realizadas usando Platinum® *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação de PCR conteve 8 ng de produto de PCR de terminador PDC e marcador selecionável URA3 de 2000 pares de base, 24 ng do produto de PCR do promotor PDC de

700 pares de base, 50 pM de cada um dos iniciadores 0611184 e 0611185, 1X tampão de amplificação *Pfx* (Invitrogen), 2 mM de MgSO_4 , 0,2 mM de mistura de dNTP, 2,5 Unidades de Platinum[®] *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) em um *volume final de* 100 μL . As reações de amplificação foram incubadas em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado por 1 ciclo a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 68°C por 3 minutos; e 1 ciclo a 68°C por 3 minutos.

[0227] Os produtos de PCR de 2700 pares de base foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Um fragmento de aproximadamente 2700 pares de base foi excisado do gel e extraído da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK[®] (Qiagen).

[0228] O produto de PCR de 2700 pares de base foi clonado no vetor pCR[®]4BLUNT TOPO[®] (Invitrogen) usando o kit de clonagem de PCR Zero Blunt[®] TOPO[®] para o sequenciamento (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Em um volume de reação total de 6 μL 1 ou 4 μL dos produtos de PCR de 2700 pares de base, 1 μL de solução salina (Invitrogen) e 1 μL de pCR[®]4BLUNT TOPO[®] (Invitrogen) foram incubadas junto na temperatura ambiente por 15 minutos. 2 μL de cada reação de clonagem foram transformados em células de *E. coli* One Shot[®] TOP10 Quimicamente Competentes (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto à inserção apropriada do produto de PCR desejado pela digestão de *NotI*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMIBa100.

[0229] O plasmídeo pHJJ76 (Figura 24) contém homologia

para permitir a integração de gene no local *adh1202*. O plasmídeo pHJJ76 foi digerido com *NotI* para remover o marcador selecionável URA3 presente dentro das sequências de homologia *adh1202*. O pHJJ76 digerido foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Um fragmento de 5,2 kbp foi extraído da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen), e depois ligado de volta junto usando T4 DNA ligase. Os produtos de ligação foram transformados em células da *E. coli* Quimicamente Competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários transformantes resultantes foram triados pela digestão de *ApaI* e *SacI*. Um clone que produz os produtos de digestão desejados foi designado pHJJ76-no ura.

[0230] O promotor e terminador PDC e marcador selecionável URA3 de pMiBa100 (*supra*) foram clonados no pHJJ76-no ura para criar um plasmídeo onde um gene pode ser colocado sob o controle do promotor e terminador PDC para a integração em *adh1202*. pHJJ76-no ura foi digerido com *NotI* seguido pelo tratamento com CIP. O fragmento de 5,2 kbp linear foi purificado usando um Kit de Purificação de PCR QIAQUICK® (Qiagen). pMiBa100 foi digerido com *NotI* e conduzido em um gel de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Um fragmento de 2742 pares de base foi excisado do gel, extraído usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen), e depois ligado dentro do fragmento de 5,2 kbp de pHJJ76-no ura usando T4 DNA Ligase. Os produtos de ligação foram transformados em células de *E. coli* Quimicamente Competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados sobre placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados pela digestão. Um clone que produz

os produtos de digestão desejados foi designado pMIBa107 (Figura 2).

Exemplo 2E: Construção dos fragmentos de vetor de inserção para a expressão de genes exógenos múltiplos no local PDC

[0231] Os fragmentos de vetor de inserção que seguem podem ser usados para gerar uma construção de DNA planejada que substitui um gene de PDC de *I. orientalis* endógeno com um cassete que expressa genes múltiplos, por exemplo, três genes aqui descritos expressos a partir dos promotores de PDC, ENO1, e TDH3. A recombinação homóloga entre a construção à esquerda (pMhCt068 e derivados) e a construção à direita (pMhCt069 e derivados) resulta na expressão da proteína URA3, que resulta na conversão da cepa de auxotrofia de uracila para prototrofia de uracila, permitindo a seleção de integrantes desejados. A extremidade 5' de cada construção à esquerda é homóloga ao DNA a montante do local PDC, enquanto que a extremidade 3' de cada construção à direita é homóloga ao DNA a jusante do local PDC. Estas regiões homólogas servem para alvejar o cassete de expressão ao local PDC. Este método de alvejamento é esquematicamente representado na Figura 3-, e pode ser modificado para usar qualquer combinação de genes múltiplos aqui descritos para alvejar qualquer local adequado, por exemplo, qualquer local descrito acima, tal como um local ADH (ver exemplo abaixo) ou um local ALD.

Construção de um fragmento à esquerda

[0232] Uma construção à esquerda de vetor vazio, pMhCt068, foi clonada em etapas múltiplas como descrito abaixo.

[0233] Um fragmento de PCR contendo o promotor da região PDC e sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador foi amplificado a partir do DNA genômico de *I. orientalis* usando os iniciadores 0611166 e 0611167.

[0234] A reação de PCR (50 µL) conteve 100 ng de DNA genômico de *I. orientalis* (preparável, por exemplo, usando um Kit de

Purificação de DNA de Levedura MasterPure® da EPICENTRE® Biotechnologies), Tampão de Reação 1X ThermoPol (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611166 e 0611167, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 2 µL de MgSO₄ a 100 mM, e 2 unidades de Vent_R® (exo-) DNA polimerase (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 94°C por 2 minutos, seguido por 34 ciclos cada um a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 780 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel, Betlehem, PA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

[0235] Um fragmento de PCR contendo a região terminadora TAL e os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador foi amplificado a partir de pACN5 (Figura 19) usando os iniciadores 0611168 e 0611169. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de DNA plasmídico mini-prep pACN5, tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611168 e 0611169, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO e 1 unidade de iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 460 pares de base foi

excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN[®] Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0236] A PCR depois foi usada para criar um único produto de amplificação fundindo ambos os produtos acima. A reação de PCR (50 µL) conteve 125 ng do produto de PCR contendo o promotor PDC, 76 ng do produto de PCR contendo o terminador TAL, Tampão de Reação 1X ThermoPol (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611166 e 0611169, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 2 µL de MgSO₄ 100 mM, e 2 unidades de Vent[®] (exo-) DNA polimerase (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 94°C por 2 minutos, seguido por 34 ciclos cada um a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 1,250 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN[®] Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0237] Um fragmento de PCR contendo a região promotora ENO1 e sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador foi amplificado a partir de pACN43 (Figura 22) usando os iniciadores 0611170 e 0611171. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de DNA plasmídico pACN43 mini-prep, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611170 e 0611171, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de Phusion[®] High-Fidelity DNA polimerase (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma

extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR com aproximadamente 1050 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0238] Um fragmento de PCR contendo a região terminadora RKI seguida pela região promotora URA3 e a extremidade 5' da ORF de URA3, junto com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador, foi amplificado a partir de pACN43 (Figura 22) usando os iniciadores 0611172 e 0611173. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de DNA plasmídico pACN43 mini-prep, tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611172 e 0611173, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO e 1 unidade de iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR com aproximadamente 1400 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0239] A PCR foi usada para criar um único produto de amplificação fundido a ambos dos produtos acima. A reação de PCR (50 µL) conteve 93 ng do promotor ENO1 contendo produto de PCR (*supra*); 125 ng do terminador RKI, promotor ura3 e produto de PCR contendo a ORF parcial (*supra*); tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs); 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611170 e 0611173; 200 µM de cada um de dATP, dCTP,

dGTP, e dTTP; 1,5 µL de DMSO; e 1 unidade de Phusion® High-Fidelity DNA polimerase (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 56°C por 20 segundos, e 72°C por 2 minutos e 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 2460 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0240] Para criar um vetor receptor para os produtos de PCR, o plasmídeo pMhCt017 (o vetor de clonagem padrão pUC19 com um inserto irrelevante) foi digerido com *Hind* III e *Eco*RI, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 2,6 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento purificado de *Hind* III a *Eco*RI resultante foi idêntico a aquele encontrado em pUC18 (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. e Messing, J. (1985) Gene, 33, 103-119).

[0241] Os produtos de PCR de 1250 pares de base e 2460 pares de base purificados do acima foram depois inseridos dentro do fragmento pMhCt017 digerido usando um Kit de Clonagem de PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em um volume de reação total de 10 µL composto de 125 ng de fragmento de vetor de *Hind* III para *Eco*RI de pMhCt017, 92 ng do promotor PDC e produto de PCR de terminador TAL, 165 ng do promotor ENO1 e promotor ura3 e produto de PCR contendo a ORF parcial, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL de enzima IN-

FUSION[®] (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação depois foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados sobre placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados para a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *Apa* LI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e pMhCt068 designado.

[0242] O plasmídeo pMhCt068 contém a região promotora de PDC seguido pelos sítios de restrição *Nhe*I e *Asc*I para a adição de um gene ectópico de interesse aqui descrito, o terminador TAL, a região promotora ENO1 seguida pelos sítios de restrição *Xba*I e *Pac*I para a clonagem de um segundo gene ectópico de interesse aqui descrito, o terminador RKI, o promotor *ura3* de *I. orientalis* e a extremidade 5' da ORF URA3 de *I. orientalis*. O plasmídeo pMhCt068 foi descoberto ter uma mudança de nucleotídeo de A para T a cerca de 200 pares de base dentro do promotor PDC, uma mudança de G para T a cerca de 2/3 do caminho dentro do promotor PDC, e um códon de partida prematuro (ATG) presente no lado 5' do sítio de restrição *Nhe*I. Consequentemente, uma versão corrigida de pMhCt068 foi construída como descrito abaixo.

[0243] A região do promotor PDC foi amplificada pela PCR a partir de pACN5 (Figura 19) com os iniciadores 0611166 e 0611828, que não introduzem o códon de partida indesejado acima. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição de 1 para 50 de uma mini-prep de pACN5, Tampão de Reação 1X ThermoPol (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611166 e 0611828, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 2 µL de MgSO₄ a 100 mM, e 2 unidades de

Vent_R[®] (exo-) DNA polimerase (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 94°C por 2 minutos, seguido por 34 ciclos cada um a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 780 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN[®] Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0244] O produto de PCR contendo o promotor PDC foi depois fundido ao produto de PCR contendo o terminador TAL como descrito acima. Visto que o fragmento de PCR de terminador TAL foi fabricado com o iniciador 0611168, os produtos de fusão da PCR resultantes devem ser uma mistura, com produtos que carecem do códon de partida prematuro e incluem o códon de partida indesejado. O produto de PCR de ~1250 pares de base resultante foi purificado e combinado por intermédio do Kit de Clonagem de PCR IN-FUSION[®] Advantage (Clontech) com o produto de fusão de PCR contendo o terminador RKI, promotor ura3 e ORF parcial e pUC18 como descrito acima. Um clone que produz o padrão de digestão ApaLI esperado foi mostrado estar correto pelo sequenciamento de DNA, incluindo a ausência desejada de mutações no promotor PDC e falta de ATG 5' prematuro do sítio de restrição *NheI*, e designado pMhCt082.

Construção de um fragmento à direita

[0245] A construção do vetor vazio à direita, pMhCt069, foi clonada em etapas múltiplas como descritas abaixo.

[0246] Um fragmento de PCR contendo a extremidade 3' da ORF URA3 de *I. orientalis*, o terminador URA3 (os 275 pares de base a jusante do códon de parada URA3), o promotor ura3 (para servir como uma

região de repetição para enlaçamento do marcador depois da integração dentro da levedura hospedeira) e sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador foi amplificado a partir de pACN43 (Figura 22) usando os iniciadores 0611174 e 0611175. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de DNA plasmídico pACN43 mini-prep, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611174 e 0611175, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de DNA polimerase Phusion® High-Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 1210 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0247] Um fragmento de PCR contendo a região promotora TDH3 e os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador foi amplificado a partir de pACN23 (Figura 20) usando os iniciadores 0611176 e 0611177. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de DNA plasmídico pACN23 mini-prep, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611176 e 0611177, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de DNA polimerase Phusion® High-Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da

PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 1028 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN[®] Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0248] Um fragmento de PCR contendo a região 3' do códon de parada do gene *I. orientalis* da região PDC (região terminadora PDC) e sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador foi amplificado a partir do DNA genômico de *I. orientalis* usando os iniciadores 0611178 e 0611179. A reação de PCR (50 µL) conteve 100 ng de DNA genômico *I. orientalis*, tampão de 1X iProof[®] HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611178 e 0611179, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO e 1 unidade de DNA polimerase iProof[®] High Fidelity (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 938 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN[®] Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0249] A PCR foi usada para criar um único produto de amplificação fundindo ambos dos dois últimos produtos de PCR descritos acima. A reação de PCR (50 µL) conteve 125 ng do produto de PCR contendo o promotor TDH3, 114 ng do produto de PCR contendo a região terminadora de PDC, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611176 e 0611179, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de DNA polimerase Phusion[®] High-Fidelity

(New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos, seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 56°C por 20 segundos, e 72°C por 2 minutos e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 1966 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0250] O produto de PCR de 1210 pares de base purificado e o produto de fusão da PCR com 1966 pares de base do acima foram depois inseridos dentro do fragmento pMhCt017 digerido com *Hind* III e *Eco*RI como descrito acima usando um Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em um volume de reação total de 10 µL composto de 125 ng de fragmento de vetor de *Hind* III a *Eco*RI de pMhCt017, 54 ng do produto de PCR contendo a extremidade 3' da ORF de URA3 seguidos pelo terminador URA3, 200 ng do produto de fusão de PCR do promotor TDH3 e terminador PDC, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL de enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados para a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *Apa* LI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt069.

[0251] O plasmídeo pMhCt069 contém a extremidade 3' do

marcador URA3 de *I. orientalis*, o terminador URA3 correspondente, o promotor *ura3* (para enlaçamento posterior do marcador URA3), o promotor TDH3, sítios de restrição *Xba*I e *Pac*I para a subclonagem dos genes desejados para a expressão ectópica, e a região flanqueadora 3' do local de PDC.

Exemplo 2F: Construção de fragmentos de vetor de inserção para a expressão de genes exógenos múltiplos no local *adh9091*:

[0252] Os fragmentos de vetor de inserção que seguem foram planejados usando um método similar a aquele descrito no Exemplo 2E de modo a substituir um gene endógeno *adh9091* de *I. orientalis* com um cassette que expressa genes múltiplos de interesse aqui descritos.

Construção de um fragmento à esquerda

[0253] Uma construção à esquerda de vetor vazio, pGREr125, foi clonada em etapas múltiplas como descritas abaixo.

[0254] Uma construção que compreende o flanco 5' necessário para a recombinação homóloga no local *adh9091* de *I. orientalis* e o promotor do cassette de expressão vazio de PDC / terminador TAL foi clonado pela PCR dentro do vetor plasmídico pCR2.1-TOPO (Invitrogen). O fragmento do promotor PDC foi amplificado pela PCR a partir do plasmídeo pACN5 (Figura 19) usando os iniciadores 0611250 e 0611251. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng de DNA de pACN5 plasmídico, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611250 e 0611251, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da

termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 900 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de aproximadamente 753 pares de base com um sítio de restrição *NotI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *PacI* e um *XbaI* na extremidade 3' do fragmento.

[0255] UM segundo fragmento de PCR contendo homologia 5' com o produto de PCR acima incluindo os sítios de restrição *XbaI* e *PacI* foi gerado para amplificar a região terminadora TAL a partir do plasmídeo pACN5 (Figura 19) usando os iniciadores 0611252 e 0611253. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng do plasmídeo pACN5 DNA (*supra*), tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611252 e 0611253, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 900 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de cerca de 435 pares de base com sítios de restrição *XbaI* e *PacI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *Pisei* na extremidade 3'.

[0256] O fragmento de 753 pares de base e o fragmento de 435 pares de base foi fundido juntos pela PCR usando os iniciadores 0611250 e 0611253, levando a um fragmento resultante de 1149 pares de base em que o promotor PDC está a montante do terminador TAL. A reação de PCR (50 µL) conteve 125 ng do fragmento de 753 pares de base, 75 ng do fragmento de 435 pares de base, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611250 e 0611253, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade da DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, produto da reação de PCR foi separado pela eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR com aproximadamente 1149 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0257] Um fragmento de PCR contendo homologia 3' ao produto de PCR de 1149 pares de base acima incluindo o sítio de restrição *NotI*, foi gerado para amplificar o flanco 5' para o local adh9091 de *I. orientalis* usando os iniciadores 0611254 e 0611255. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng do plasmídeo pHJJ27 (Figura 21) como DNA padrão, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611254 e 0611255, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos seguido por 35 ciclos cada

um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 900 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante é de aproximadamente 891 pares de base com um sítio de restrição *HpaI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *NotI* na extremidade 3'.

[0258] O fragmento de 891 pares de base depois foi fundido a montante do fragmento do promotor PDC/ terminador TAL de 1149 pares de base pela PCR usando os iniciadores 0611254 e 0611253 gerando um fragmento de aproximadamente 2005 pares de base. A reação de PCR (50 µL) conteve 125 ng do fragmento de 1149 pares de base, 95 ng do fragmento de 891 pares de base, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611254 e 0611253, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 2005 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0259] O fragmento de 2005 pares de base resultante, que

compreende o flanco 5' para a integração no local adh9091, o promotor PDC e o terminador TAL, foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO e transformado nas células da *E.coli* One-Shot TOP10 usando um kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados para a inserção apropriada do fragmento desejado pela digestão em *Ava*I. Um clone que produz os tamanho de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr112. O plasmídeo pGMEr112 compreende o flanco 5' para a recombinação homóloga no local adh9091 seguido pelo promotor PDC/terminador TAL do cassete de expressão vazio.

[0260] O gene marcador URA3 5' truncado direcionado pelo fragmento de promotor ura3 foi amplificado pela PCR a partir do plasmídeo pHJJ27 (Figura 21) usando os iniciadores 0611283 e 0611263. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng de plasmídeo pHJJ27, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611263 e 0611283, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 900 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de aproximadamente 885 pares de base com os sítios de

restrição *HpaI* e *PmeI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *NheI* na sua extremidade 3'.

[0261] O fragmento de 885 pares de base resultante foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO e transformado nas células da *E. coli* One-Shot TOP10 usando um kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do inserto desejado pela digestão de *BglI*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr108. O plasmídeo pGMEr108 compreende o promotor *ura3* seguido pelo segmento 5' truncado do gene *URA3*, tal fragmento é flanqueado pelos sítios de restrição *HpaI* e *PmeI* na extremidade 5' e pelo sítio de restrição *NotI* na extremidade 3'.

[0262] Um fragmento de restrição de *HpaI* e *PmeI* de 1998 pares de base do plasmídeo pGMEr112 (*supra*), que compreende o flanco 5' *adh9091* seguido pelo promotor de construção de PDC/ terminador TAL, foi ligado ao vetor de 4806 pares de base de pGMEr108 (*supra*) linearizado pelos *HpaI* e *PmeI*. Os produtos de reação de restrição dupla foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde o fragmento de inserto de 1998 pares de base e o fragmento vetor de 4806 pares de base foram excisados do gel e purificados usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de ligação foi realizada usando uma razão de 1:3 vetor:inserto; em particular a reação foi ajustada com 2 µL do vetor linearizado de 4806 pares de base, 6 µL do fragmento de inserto de 1998 pares de base, 9 µL de tampão de reação de ligação 2X Quick e 1 µL de T4 DNA Ligase Quick (New England Biolabs), e realizada de acordo com as instruções do fabricante.

[0263] Cinco µL do produto de ligação foram transformados em Células Ultracompetentes XL10-Gold® da *E. coli* (Agilent

Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos inserto desejados pela digestão com *Hind* III. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr117.

[0264] O plasmídeo pGMEr117 compreende o flanco 5' adh9091, seguido pelo promotor do cassete de expressão vazio de PDC/terminador TAL e pelo gene 5' URA3 truncado direcionado pelo promotor ura3. Adicionalmente, o plasmídeo pGMEr117 carrega dois sítios de restrição *Xba*I diferentes: um primeiro sítio de restrição entre o promotor PDC e o terminador TAL (e adjacente ao sítio de restrição *Pac* I) que pode ser usado para inserir o gene de interesse, e um segundo sítio de restrição *Xba*I que foi herdado da cadeia principal de pCR2.1-TOPO original. De modo a eliminar este segundo sítio de restrição *Xba*I, o plasmídeo pGMEr117 foi digerido com enzima de restrição *Apa*I, e o plasmídeo linearizado foi depois tratado com a enzima DNA polimerase I, fragmento grande (Klenow) (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. O vetor linear resultante (contendo extremidades abruptas) foi digerido com enzima de restrição *Eco*RV, que corta um fragmento de 43 pares de base do vetor que compreende o sítio de restrição *Xba*I. Os produtos de reação de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE e o fragmento de vetor de 6761 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. a reação de auto ligação foi ajustada com 3 µL do vetor linearizado, 6 µL de água duplamente destilada estéril, 10 µL de tampão de reação de ligação 2 X Quick e 1 µL de Quick T4 DNA Ligase (New England Biolabs) e realizada de acordo com as instruções do fabricante.

[0265] Cinco µL do produto de ligação foram

transformados em Células Ultracompetentes XL10-Gold® da *E. coli* (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do inserto desejado pela digestão *Xba*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr122.

[0266] O fragmento promotor ENO1 foi amplificado pela PCR a partir do plasmídeo pACN43 (Figura 22) usando os iniciadores 0611295 e 0611296. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng de plasmídeo pACN43, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611295 e 0611296, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR com aproximadamente 1009 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de aproximadamente 1009 pares de base com um sítio de restrição *Pme*I na extremidade 5' do fragmento e sítios de restrição *Apa*I e *Nru*I na extremidade 3'.

[0267] Um segundo fragmento de PCR contendo homologia 5' ao produto de PCR acima, incluindo os sítios de restrição *Nru*I e *Apa*I, foi gerado para amplificar a região terminadora RKI do plasmídeo pACN43 (Figura 22) usando os iniciadores 0611297 e 0611298. A reação de PCR (50

μL) conteve 15 ng de DNA plasmídico pACN43, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611297 e 0611298, 200 μM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 μL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR com aproximadamente 438 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de cerca de 438 pares de base com os sítios de restrição *NruI* e *ApaI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *PmeI* na extremidade 3' do fragmento.

[0268] O fragmento promotor de 1009 pares de base e o fragmento terminador de 438 pares de base foram fundidos juntos pela PCR usando os iniciadores 0611295 e 0611298, levando a um fragmento de aproximadamente 1447 pares de base no qual o promotor ENO1 está a montante do terminador RKI. A reação de PCR (50 μL) conteve 125 ng do fragmento de 1009 pares de base, 65 ng do fragmento de 438 pares de base, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611295 e 0611298, 200 μM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 μL de DMSO (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 2 minutos,

com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, o produto da reação de PCR foi separado pela eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 1447 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0269] O fragmento de 1447 pares de base resultante, que compreende a construção promotor ENO1 /terminador RKI, foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO e transformado em células de *E.coli* One-Shot TOP10 usando um kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do fragmento desejado pela digestão *Bam* HI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr114, que compreende o cassete de expressão vazio promotor ENO1/terminador RKI.

[0270] Os plasmídeos pGMEr122 e pGMEr114 foram digeridos com enzima de restrição *Pme*I a 37°C por 3 horas. Aproximadamente uma hora antes de parar cada reação de digestão, 1 µL de Fosfatase Alcalina Intestinal De Bezerro (New England Biolabs) foi adicionado a cada tubo de digestão de modo a desfosforilar as extremidades e impedir a autoligação. O fragmento de vetor de 6761 pares de base resultante do plasmídeo pGMEr122, e o fragmento de inserto resultante que compreende a construção promotor ENO1/terminador TAL (1439 pares de base) do plasmídeo pGMEr114, foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão de 1X TBE, excisado do gel, e purificado usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0271] Uma reação de ligação subsequente foi depois preparada compreendendo 3 µL do fragmento de vetor do plasmídeo

pGMEr122, 4 µL do fragmento de inserto do plasmídeo pGMEr114, 2 µL de água dd estéril, 10 µL de Tampão de Ligase 2X Quick e 1 µL de Ligase Quick T4 (New England Biolabs) e realizada de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação acima foi transformada em células da *E. coli* Ultracompetentes XL10-Gold® (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do inserto desejado pela digestão usando *Xba*I e *Bst* BI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado pelo sequenciamento e designado pGMEr125. A construção promotor ENO1 /terminador RKI foi inserida em orientações opostas, resultando em duas versões de plasmídeo pGMEr125 designadas (a) e (b) (Figuras 4 e 5).

[0272] Os plasmídeos pGMEr125a e pGMEr125b contêm a região do promotor PDC, a do terminador TAL, a região do promotor ENO1, o terminador RKI, o promotor *ura3* de *I. orientalis*, a extremidade 5' do marcador URA3 correspondente e a região flanqueadora 5' do local *adh9091* de *I. orientalis*.

Construção de um fragmento à direita

[0273] Uma construção à direita de vetor vazio, pGREr121, foi clonado em etapas múltiplas como descrito abaixo.

[0274] O fragmento promotor TDH3 foi amplificado pela PCR a partir do plasmídeo pACN23 (Figura 20) usando os iniciadores 0611256 e 0611257. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng de DNA plasmídico pACN23, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611256 e 0611257, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF®

MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 994 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de aproximadamente 994 pares de base com um sítio de restrição *SfoI* na extremidade 5' do fragmento e sítios de restrição *PacI* e *NruI* na extremidade 3'.

[0275] Um segundo fragmento de PCR contendo homologia 5' ao produto de PCR acima, incluindo os sítios de restrição *NruI* e *PacI*, foi gerada para amplificar a região terminadora de TKL a partir do plasmídeo pACN23 (Figura 20) usando os iniciadores 0611258 e 0611259. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng de DNA plasmídico de pACN23, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611258 e 0611259, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR com aproximadamente 469 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de

PCR resultante foi de cerca de 469 pares de base com sítios de restrição *NruI* e *PacI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *NotI* na extremidade 3'.

[0276] Os fragmentos de 994 pares de base e 469 pares de base acima foram fundidos juntos pela PCR usando os iniciadores 0611256 e 0611259, levando a um fragmento de aproximadamente 1433 pares de base em que o promotor TDH3 está a montante do terminador TKL. A reação de PCR (50 µL) conteve 125 ng do fragmento de 994 pares de base, 60 ng do fragmento de 469 pares de base, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 061159 e 0611256, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, o produto da reação de PCR foi separado pela eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 1433 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0277] Um fragmento de PCR contendo homologia 5' com a extremidade 3' do produto de PCR de 1433 pares de base acima que inclui o sítio de restrição *NotI* foi gerado para amplificar o flaco 3' para o local adh9091 usando os iniciadores 0611260 e 0611261. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng de DNA plasmídico pHJJ27 (Figura 21) como DNA padrão, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611260 e 0611261, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA

polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR com aproximadamente 1019 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante é de aproximadamente 1019 pares de base com um sítio de restrição *NotI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *ApaI* na extremidade 3'.

[0278] O fragmento de 1019 pares de base foi depois fundido a jusante do fragmento promotor TDH3 / fragmento terminador TKL de 1433 pares de base pela PCR usando os iniciadores 0611256 e 0611261 gerando um fragmento de aproximadamente 2405 pares de base. A reação de PCR (50 µL) conteve 125 ng do fragmento de 1433 pares de base, 90 ng do fragmento de 1019 pares de base, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611256 e 0611261, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR com aproximadamente 2405 pares de base foi excisado

do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0279] O fragmento de 2405 pares de base resultante que compreende o flanco 3' para a integração no local adh9091 a jusante da construção do promotor TDH3 /terminador TAL foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO e transformado nas células de *E.coli* One-Shot TOP10 usando um kit de clonagem TOPO TA, (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp placas e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do fragmento desejado pela digestão com *Ava*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr113. O plasmídeo pGMEr113 compreende o flanco 3' para a recombinação homóloga no local adh9091 de *I. orientalis* precedido pelo cassete de expressão vazio promotor TDH3 / terminador TKL.

[0280] A PCR foi usada para amplificar o fragmento 3' truncado da ORF URA3, o terminador URA3, e o promotor ura3 (para servir como uma região de repetição para enlaçamento do marcador depois da integração dentro do hospedeiro de levedura como descrito acima) a partir do plasmídeo pHJJ27 (Figura 21) usando os iniciadores 0611264 e 0611284. A reação de PCR (50 µL) conteve 15 ng do DNA plasmídico pHJJ27, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611264 e 0611284, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por

eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR com aproximadamente 1324 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de aproximadamente 1324 pares de base com um sítio de restrição *NheI* na extremidade 5' do fragmento e sítios de restrição *ApaI* e *SfoI* na extremidade 3'.

[0281] O fragmento de 1324 pares de base purificado em gel acima foi clonado dentro do vetor pCR2.1-TOPO e transformado nas células da *E. coli* One-Shot TOP10 usando um kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do inserto desejado pela digestão com *Hind* III. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr109. O plasmídeo pGMEr109 compreende o fragmento 3' da ORF URA3 e o terminador URA3, seguido pelo promotor *ura3*. A porção a montante do fragmento 3' do gene URA3 no plasmídeo pGMEr109 carrega uma homologia de 460 pares de base com a extremidade do fragmento 5' URA3 truncado clonado no plasmídeo pGMEr108. A região de homologia permite a recombinação entre as duas porções do gene criando um marcador de seleção funcional na cotransformação do organismo hospedeiro com a construção contendo ambos os segmentos.

[0282] O plasmídeo pGMEr109 foi digerido com *KpnI*, e tratado com DNA polimerase I, fragmento grande (Klenow) (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo pGMEr109 linearizado (contendo extremidades abruptas) foi digerido com *Bam* HI. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE e o fragmento de vetor de 5247 pares de base foi excisado do gel

e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0283] O plasmídeo pGMEr113 foi digerido com *Bam* HI e *Eco* RV resultando em um fragmento de 2466 pares de base que carrega a construção promotor TDH3/terminador TKL seguido pelo fragmento 3' truncado da ORF URA3 com o terminador URA3, seguido pelo promotor *ura3*. Os produtos de reação de restrição dupla foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE e o fragmento de vetor de aproximadamente 2466 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento digerido com *Bam* HI/ *Eco* RV de 2466 pares de base depois foi ligado ao fragmento de vetor com 5247 pares de base do plasmídeo pGMEr109. A reação de ligação foi ajustada com 3 µL do vetor linearizado com 5247 pares de base, 3 µL do fragmento de inserto com 2466 pares de base, 3 µL de água dd estéril, 10 µL de tampão de reação de ligação 2X Quick e 1 µL de Quick T4 DNA Ligase (New England Biolabs), e realizada de acordo com as instruções do fabricante.

[0284] Cinco µL do produto de ligação foram transformados nas células Ultracompetentes da *E. coli* XL10-Gold® (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do inserto desejado pela digestão com *Xba*I e *Pac* I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foram confirmados e designados pGMEr121 (Figura 6).

[0285] O plasmídeo pGMEr121 contém a extremidade 3' do marcador URA3 de *I. orientalis* seguido pelo promotor *ura3* correspondente, o promotor TDH3, o terminador TKL e a região flanqueadora 3' do local *adh9091*.

Exemplo 2G: Construção de CNB1 de *I. orientalis*

[0286] CNB1 de *I. orientalis* foi construído a partir de CD1822 de *I. orientalis* como descrito abaixo (ver Exemplo 1A para a geração de CD1822 de *I. orientalis* a partir da ATCC PTA-6658 de *I. orientalis*). Ambas as cópias do gene URA3 contidas na cepa CD1822 foram deletadas para permitir o uso deste gene como um marcador de seleção para o engendramento genético. URA3 é um marcador versátil para as genéticas de levedura devido à disponibilidade de seleção, tanto pela presença (pelo crescimento em meio deficiente em uracila), quanto ausência (pelo crescimento na presença de ácido 5-fluorótico) do gene. O rompimento de um dos genes de URA3 foi feito pela substituição com um cassete de seleção contendo o marcador de seleção MEL5 flanqueado pelas sequências de DNA repetidas. As cepas que testam positivas quanto ao cassete de seleção MEL5 foram depois triadas quanto a perda do gene marcador MEL5. A perda do segundo gene de URA3 foi depois selecionada quanto ao crescimento na presença de ácido 5-fluorótico.

[0287] CD1822 foi transformado com 2,8 µg de DNA digerido com *Sac I*/*PspOMI* do vetor pMI458 (Figura 27). O plasmídeo pMI458 contém o gene MEL5 de *S. cerevisiae* (SEQ ID NO: 255) sob o controle do promotor PGK *I. orientalis* (P-IoPGK, SEQ ID NO: 247), flanqueado pelos fragmentos de DNA homólogos à sequência a montante (P-IoURA3, SEQ ID NO: 253) e a jusante (T-IoURA3, SEQ ID NO: 254) do gene de URA3 de *I. orientalis*. Os fragmentos P-IoURA3 e T-IoURA3 estão na mesma orientação relativa como no genoma *I. orientalis*. Aproximadamente 500 colônias Mel+ foram obtidas depois de cinco dias a 30°C. Dez colônias foram colônias únicas isoladas pela inoculação de um tubo de BFP (tampão de Fosfato de Butterfields) de 10 ml e plaqueando 25 µL em placas DM1 X-α-gal. Uma única colônia azul de cada um dos isolados iniciais foi depois escolhida em YPD para outra análise.

[0288] A PCR foi usada para triar transformantes quanto aos eventos genéticos desejados. Para obter-se o DNA genômico para o uso como padrão nas triagens de PCR, as células de culturas de 1,5 ml durante a noite foram giradas em um tubo de microcentrífuga com tampa de rosca e recolocadas em suspensão em 0,2 ml de Triton X-100 a 2%, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, solução 1 mM de Na₂EDTA pH 8,0. 0,2 ml de uma mistura de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) equilibrada com 10 mM de Tris pH 8,0 /1 mM de EDTA (Sigma) e 0,3 g de pérolas de vidro foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 minutos na velocidade máxima com um Mini-BeadBeater-8 (BioSpec). 0,2 ml de TE foi adicionado e o tubo foi ligeiramente turbilhonado. A fase aquosa foi separada pela centrifugação a 16.100 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido para um novo tubo e 1 ml de etanol a 100% adicionado. O tubo foi colocado a 20°C por 30 minutos, centrifugado a 16.100 x g por 5 minutos, e o líquido separado por decantação. O DNA foi secado ao ar e recolocado em suspensão em 500 µL de TE.

[0289] A triagem pela PCR para o cruzamento 5' desejado foi feito usando os iniciadores oCA405 e oCA406, que produz um produto de 1,5 kbp. A triagem quanto ao cruzamento 3' desejada foi feito usando os iniciadores WG26 e CM647, que produz um produto de 1,6 kbp. Os iniciadores fora (mais afastado a montante ou a jusante) das regiões URA3 usados para criar pMI458 são oCA405 e CM647, que produzem um produto de 3,2 kbp para o produto de do tipo selvagem, de 5,0 kbp para um alelo rompido pMI458, e produto de 2,2 kbp quando o marcador de seleção foi enlaçado. Estas reações de PCR foram feitas usando uma temperatura de recozimento de 55°C. A PCR também foi usada para triar quanto a perda da estrutura de leitura aberta de URA3 usando um método de quatro iniciadores. Os iniciadores pJLJ28 e pJLJ29 amplificam um fragmento de 800 pares de base do gene de actina e iniciadores pJLJ30 e pJLJ31 amplificam um

fragmento de 600 pares de base do gene URA3. O uso de todos os iniciadores em uma reação fornece um controle interno positivo (o fragmento de actina). Taq DNA polimerase da Roche foi usado como pelo protocolo do fabricante, com uma temperatura de recozimento de 61°C. As cepas 1822ura het MEL-1 e 1822ura het MEL-2 foram confirmadas como tendo integrado o cassete de seleção MEL5 no local de URA3.

[0290] O marcador MEL5 foi depois removido dos genomas de 1822ura het MEL-1 e 1822ura het MEL-2 deixando a recombinação entre as sequências KtSEQ1a (SEQ ID NO: 256) e KtSEQ1b (SEQ ID NO: 257). As cepas MEL+ foram cultivadas durante a noite em meios YPD até uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5 a 2,0. As culturas foram depois diluídas de volta para uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,00001 em meio YPD. 200 µL de diluição de cultura foram transferidos em cada reservatório de uma placa microtituladora de 96 reservatórios. As placas foram cobertas com uma cobertura adesiva e incubadas em um incubador a 30° C, com agitação máxima por 6 a 7 horas (divisões de aproximadamente 6 células, dependendo da taxa de crescimento da cepa). 100 µL de cada reservatório (aproximadamente ~28.000.000 cm³(~1000 cfu por placa)) foram plaqueados em meio DM1 + X-α-gal. As placas foram incubadas a 30° C durante a noite ou na temperatura ambiente por 2 dias para observar a diferenciação de cor. As colônias brancas (mel- putativo) foram riscadas em meios similares, e triadas pela PCR como descrito acima. Dois enlaçamentos independentes foram descobertos, um de 1822ura het MEL-1, salvo como 1822ura het mel-1 e o outro de 1822ura het MEL-2, salvo como 1822ura het mel-2. Extraordinariamente, a vasta maioria das colônias brancas obtidas não deu a faixa esperada de 2,2 kbp.

[0291] Para obter derivados ura, 1822ura het mel-1 e 1822ura het mel-2 foram cultivadas durante a noite em meios YP5D (YP + 100 g/L Dextrose) e alíquotas (0,5, 5 e 50 µL) da cultura durante a noite

foram plaqueados nas placas ScD-2X FOA. As colônias resistentes a FOA foram riscadas para colônias únicas e verificadas quanto ao fenótipo ura pelo plaqueamento em placas ScD-ura. Duas colônias de 1822ura het mel-2 e seis colônias de 1822ura het mel-1 foram escolhidas para outra análise. Estas colônias foram cultivadas durante a noite em YPD e o DNA genômico foi extraído usando o método do fenol/clorofórmio acima.

[0292] A presença da estrutura de leitura aberta URA3 foi triada com PCR; nenhuma das oito cepas conteve o gene URA3. Dois descendentes de ura de 1822ura het mel-1 foram chamados de yJLJ3 (CNB1) e yJLJ4. No sequenciamento com base genômica, yJLJ3 (CNB1) e yJLJ4 foram determinados conter uma deleção tanto do gene URA3 quanto de um gene vizinho à permease; preferivelmente apenas o gene URA3 seria deletado. Para criar um auxótrofo ura3 de CD1822 sem rompimento deste gene de permease, CD1822 foi transformado com 1 µg de pCM208 digerido com *Sac I/ApaI* (Figura 28). O plasmídeo pCM208 contém sequência homóloga de DNA das regiões flangeadoras a montante (flanco 5' URA (próximo), SEQ ID NO: 258) e à jusante (flanco 3' URA3 (próximo), SEQ ID NO: 259) do gene URA3 de *I. orientalis*. Aproximadamente 200 colônias Mel+ foram obtidas depois de cinco dias a 30°C. Oito colônias azuis foram isoladas riscando-se em placas ScD X- α-gal. A PCR foi usada para triar transformantes para os eventos genéticos desejados. A triagem cruzada 5' foi feita usando os iniciadores oJY11 e oJY12, que produz um produto de 0,9 kbp em transformantes desejados. A triagem cruzada 3' foi feita usando os iniciadores oJY13 e oJY14, que produzem um produto de 1,0 kbp nos transformantes desejados. Três das oito colônias mostraram os produtos de PCR desejados. Os marcadores MEL para estas colônias podem ser enlaçados e o segundo gene URA3 deletado como descrito acima. Alternativamente, as deleções de URA3 e gene de permease em cepas derivadas da yJLJ3 ou yJLJ4 podem ser fixadas em uma transformação de etapa única, como descrito no

Exemplo 2H.

Exemplo 2H: Construção da cepa de controle MBin500 contendo o marcador de seleção URA3

[0293] Como descrito *supra*, a cepa de *I. orientalis* designada CNB1 aqui usada foi um auxótrofo de uridina devido à deleção homozigota do gene URA3. Um reparo heterozigoto do local URA3 foi feito usando o vetor ura fix, pJLJ62 (Figura 26) que contém um cassete ura fix compreendido do gene URA3 com 691 pares de base do flaqueador de DNA em 5', e 1500 pares de base de flaqueador de DNA em 3'. O cassete ura fix é flaqueado por um sítio de restrição *NotI* em 5' e um sítio de restrição *ApaI* em 3'. Uma digestão de restrição usando *NotI* e *ApaI* foi realizada para remover o cassete ura fix de 2796 pares de base da cadeia principal do vetor. A digestão foi purificada usando um kit de purificação pela PCR QIAquick (Qiagen) como especificado pelo fabricante. O DNA foi eluído em água destilada em vidro e 1 µg foi usado para transformar CNB1 de *I. orientalis*. Os transformantes foram selecionados em placas de seleção ura, e uma única colônia que não requer a suplementação de uridina foi designada MBin500.

Exemplo 2I: Remoção do marcador de seleção URA3

[0294] De modo a isolar cepas em que o gene marcador de seleção de URA3 foi removido por intermédio de recombinação das duas regiões promotoras de URA3 presentes nos cassetes de integração, a cepa ura+ de interesse foi inoculada em 3 ml de meio de YP+10% de glicose e cultivadas com agitação a 250 rpm a 37°C por pelo menos quatro horas e até durante a noite. 50 a 100 µL da cultura foram plaqueados em placa ScD FOA e cultivadas a 37°C por 48 a 60 horas até que as colônias apareceram. O crescimento em FOA selecionado para a remoção do marcador URA3 visto que FOA é convertido a um composto tóxico pela proteína URA3, resultando na morte das células ura+. Várias colônias resistentes a FOA foram purificadas duas vezes pelo cultivo em placas YPD a 37°C. Estes isolados

purificados foram depois triados quanto ao enlaçamento de URA3 apropriados por intermédio da PCR como aqui descrito.

Exemplo 2J: Procedimento para cultivo em frasco agitado de cepas modificadas de levedura para a análise pela eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e ensaios de enzima

[0295] Quatro ml de meio de seleção ura foram adicionados a um tubo Falcon de 14 ml e a cepa desejada foi inoculada neste meio usando uma alça estéril. A cultura foi cultivada com agitação a 250 rpm durante a noite (~16 horas) a 37°C. Para as cepas que têm pelo menos uma cópia do tipo selvagem do local *I. orientalis*, 500 µL da cultura durante a noite foram adicionados a um frasco provido de septo de 125 ml contendo 25 ml de meio de YP+10% de glicose. Para as cepas *pdca/pdca*, 1 ml da cultura durante a noite foi adicionado a um frasco provido de septo de 125 ml contendo 25 ml de meio de YP+100 g/L de dextrose líquido. O frasco foi cultivado com agitação a 250 rpm a 37°C. Aliquotas pequenas da cultura foram retiradas em intervalos aproximadamente de hora em hora e a OD₆₀₀ foi medida. A cultura foi cultivada até que a OD₆₀₀ estivesse entre 4 e 6.

[0296] De modo a preparar uma amostra pequena de células para a análise de SDS-PAGE, um volume de cultura correspondente a 2,5 unidades OD foi tirado para a cultura e colocado em um tubo de 1,5 ml. As células foram pelotizadas a 16.100 x g, o sobrenadante removido, e a pelota de célula armazenada a -20°C até o uso.

[0297] As células remanescentes no frasco de cultivo foram colhidas pela centrifugação a 2279 x g na temperatura ambiente, a pelota foi recolocada em suspensão em 12,5 ml de NaCl 0,85 M, depois centrifugadas a 2279 x g na temperatura ambiente. A pelota foi recolocada em suspensão em 1 ml de NaCl 0,85 M, e as células recolocadas em suspensão foram transferidas para um tubo de 2,0 ml e depois pelotizadas a 16.100 x g. O

sobrenadante foi depois removido e a pelota armazenada a -20°C se elas fossem ser usadas para ensaios enzimáticos dentro de uma semana, ou a -80°C para armazenagem de duração mais longa.

[0298] Para a análise de SDS-PAGE da pelota de célula correspondente a 2,5 unidades OD, as células foram recolocadas em suspensão em 100 dH₂O, depois 100 μL de NaOH 0,2 M foram adicionados. A amostra foi incubada na temperatura ambiente por 5 minutos, depois as células foram pelotizadas pela centrifugação a 16.100 x g e recolocadas em suspensão em 100 μL de tampão de amostra SDS (Bio-Rad Laboratories). A amostra foi aquecida a 95°C por 5 minutos e as células foram pelotizadas pela centrifugação ligeira. De 1 a 5 μL do sobrenadante foram analisados em um gel Criterion 8-16% Pre-Cast (Bio-Rad Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante. As faixas foram visualizadas usando Solução de Tingimento Com base em Coomassie InstantBlue® (Expdeon Protein Solutions, San Diego, CA, USA).

Exemplo 2K: Procedimento para o cultivo em frasco agitado de cepas de levedura modificadas para a análise de produto

[0299] As cepas foram riscadas para colônias únicas em Placas de Seleção de Ura e incubadas a 30°C por 1 a 2 dias. As culturas de semente foram preparadas em frascos providos de septo de 250 ml contendo 50 ml de meio de frasco agitado CNB1 inoculado com 1 a 2 colônias da Placa de Seleção Ura. As culturas de semente foram cultivadas por aproximadamente 18 horas a 30°C com agitação a 200 rpm. As alíquotas pequenas da cultura foram depois retiradas para medir a OD₆₀₀ até atingir uma OD₆₀₀ de 4 a 6. A glicose residual presente foi medida usando uma Tira de Reagente Uristix® (Bayer, Elkhart, IN, USA). O cultivo do frasco de semente foi usado para inocular frascos providos de septo de 125 ml contendo 50 ml de meio de frasco agitado CNB1 a uma OD₆₀₀ = 0,2. As culturas foram incubadas a 30°C com agitação a 140 rpm por 20 horas. As amostras do caldo

foram removidas para análise como descrito abaixo. Uma alíquota da amostra foi usada para medir a densidade óptica (OD) da cultura e a glicose residual presente foi medida usando uma Tira de Reagente Uristix[®]. O resto da amostra foi depois centrifugada e o sobrenadante usado para a análise de produto.

Exemplo 2L: Procedimento para a fermentação de cepas de levedura modificadas para a análise de produto

[0300] As cepas aqui descritas são cultivadas usando um estágio de propagação de semente e seguido por uma fermentação de estágio único em um biorreator de 2 L (Applikon, Foster City, CA, USA).

[0301] Para a preparação de estágio de semente 25 ml de meio 1X DM2 (ajustado ao pH desejado com KOH) foi adicionado a um frasco provido de septo de 125 ml, seguido pela inoculação com a cepa de interesse usando uma alça estéril. A cultura foi cultivada com agitação a 250 rpm na temperatura desejada durante a noite por aproximadamente 16 horas. As alíquotas pequenas da cultura foram depois retiradas em intervalos aproximadamente de hora em hora para medir a OD₆₀₀ até atingir uma OD₆₀₀ de 4 a 6.

[0302] A glicose residual presente foi medida usando uma Tira de Reagente Uristix[®] (Bayer, Elkhart, IN, USA). 12 ml da cultura foram depois adicionados a 4 ml de 75% de glicerol gelado estéril, misturados cuidadosamente, e incubadas em gelo por dez minutos. A cultura e mistura de glicerol foram depois remisturadas e 1,0 ml foi aliquoteado a cada um dos 10 criofrascos de 1,8 ml estéreis (Thermo Scientific, Rochester, NY, USA) e armazenados a -80° C.

[0303] 25 ml do cultivo em frascos de semente foram usados para inocular o biorreator de 2 L contendo 1,5 L de meio DM2. A fermentação no biorreator foi realizada em uma temperatura de cerca de 30°C a 40°C, com o pH controlado na faixa de cerca de 2,0 a 7,0 e sob condições

de agitação e aeração que levou a uma taxa de captação de oxigênio (OUR) na faixa de 2 a 45 mmol/L/h. Nos exemplos aqui apresentados, a temperatura, pH e OUR para a cultura no biorreator foram de 30°C, 4,0 e 25 a 30, respectivamente.

[0304] Amostras do caldo de fermentação foram removidas periodicamente para análise. Em resumo, uma alíquota da amostra foi usada para medir a densidade óptica (OD) da cultura, a concentração de glicose e o pH. O resto da amostra foi depois centrifugado. A pelota foi armazenada a -80° C para ensaios de enzima, e o sobrenadante foi usado para análise de 3-HP e outros compostos extracelulares. Todos os valores de produção de 3-HP aqui relatados são para o ponto de tempo de 48 horas na fermentação a menos que de outro modo especificado. A produção de dióxido de carbono e o consumo de oxigênio durante o processo de fermentação foram medidos pela determinação do teor de dióxido de carbono e teor de oxigênio dos gases ventilados do biorreator.

Exemplo 2M: Procedimento para a análise de 3-HP e β -alanina produzida pelas cepas de levedura modificadas:

[0305] As amostras de cultura foram acidificadas pela diluição 10X em ácido fórmico a 1% e filtrado através de uma placa de filtração de 96 reservatórios de 0,46 μ m. Outra diluição foi feita em água dependendo da concentração de analito na amostra. Uma outra diluição de 10X foi feita em uma amostra tampão de 1 mM de NH_4Ac , 0,1% de NH_3 e 5 mg/L de 3-HP uniformemente rotulado com ^{13}C (como padrão interno para 3-HP), ou 1% de ácido fórmico e 3 mg/L de β -alanina uniformemente rotulada com ^{13}C (como padrão interno para a β -alanina). O fator de diluição total foi de aproximadamente 100 a 1000 foi usado dependendo das concentrações de β -alanina ou 3-HP.

[0306] Uma amostra de 2 μ L foi injetada em uma HPLC Agilent 1200 (Agilent) controlada pelo programa MassHunter com um

detector Triple Quad MS/MS Agilent 6410 usando os ajustes de instrumento e as colunas listadas na Tabela 6. A razão da área de pico que quantifica o fragmento de íon para a sua contraparte de isótopo estável (do padrão interno) foi usado para quantificação para eliminar o efeito de supressão de íon e flutuação do instrumento. O desvio padrão foi abaixo de 5% nos ensaios do dia a dia.

Tabela 6: Ajustes de LC/MS/MS para a Análise de β -Alanina e 3-HP

	3-HP (^{13}C 3-HP)	β -Alanina (^{13}C β -Alanina)
<i>Coluna</i>	Xbridge HILIC Sílica 3,5 μm , 2,1 x 150 mm	Atlantis HILIC Sílica 3 μm 2,1 x 150 mm
<i>Tampão de Eluição</i>	62% de acetonitrila, 0,35 mM de NH_4Ac	38% de acetonitrila, 0,6% de ácido fórmico
<i>Taxa de Fluxo (ml/min)</i>	0,30	0,30
<i>Temperatura de Coluna</i>	50°C	45°C
<i>Tempo de Retenção (min)</i>	1,07	1,64
<i>Tempo de Condução (min)</i>	3	3
<i>Íon Precursor</i>	89 (92)	90 (93)
<i>Íon de Produto como quantificador</i>	59 (61)	72 (75)
<i>Íon de Produto como qualificador</i>	41 (43)	30 (31)
<i>Voltagem do Fragmentador</i>	50	70
<i>Energia de Colisão</i>	5 para o quantificador; 21 para o qualificador	3 para o quantificador; 7 para o qualificador
<i>Polaridade</i>	Negativa	Positiva
<i>Pressão de N_2 do Nebulizador (psi/kPa)</i>	10/69	11/76
<i>Fluxo de N_2 (L/min)</i>	32	35
<i>Temperatura do N_2</i>	300°C	340°C
<i>Capilaridade (V)</i>	4000	4000
<i>Delta EMV</i>	450	400

Exemplo 3: cepas de levedura modificadas que expressam genes do conjunto do caminho de fermentação de 3-HP

[0307] Um ou mais genes que codificam as enzimas envolvidas em vários caminhos da fermentação de 3-HP podem ser expressos,

sozinhos ou em combinação, em células de levedura hospedeiras. As enzimas do caminho de 3-HP podem ser expressas a partir dos genes exógenos, genes endógenos, ou alguma combinação destes. Os genes exógenos a serem expressos podem ser introduzidos dentro da célula de levedura usando construções de expressão de gene, por exemplo, as construções de expressão descritas no Exemplo 2. Os genes exógenos podem ser integrados dentro do genoma da levedura hospedeira em um único sítio ou em locais múltiplos, e a integração do gene exógeno pode ser emparelhada com a deleção ou rompimento de um gene alvo da At no sítio de inserção como descrito abaixo.

Exemplo 3A: Cepas de levedura modificadas que expressam genes do caminho da aspartato/malonato semialdeído

[0308] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de PEP e/ou piruvato, OAA, aspartato, β -alanina, e malonato semialdeído podem ser engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas no caminho. Os genes expressos podem incluir um ou mais de um gene de PPC, PYC, AAT, ADC, BAAT, gabT, 3-HPDH (incluindo malonato semialdeído redutase), HIBADH, ou gene de 4-hidroxibutirato desidrogenase.

[0309] Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira. Por exemplo, onde a célula hospedeira de levedura é *I. orientalis*, os genes expressos podem ser derivados de um PYC de *I. orientalis* (por exemplo, gene de PYC de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 2 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 1), AAT (por exemplo, gene de AAT de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 14 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 13), BAAT (por exemplo, gene homólogo pyd4 de *I. orientalis* que codifica a sequência de aminoácido

apresentada na SEQ ID NO: 20 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 19), ou 3-HPDH (por exemplo, gene homólogo de *I. orientalis* para o gene de YMR226C que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 26 e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 25). Onde a célula hospedeira de levedura é outra cepa de levedura tolerante a 3-HP, as sequências de gene podem ser obtidas usando técnicas conhecidas no ramo e os homólogos nativos para os genes dos caminhos podem ser expressos exogenamente ou em conjunção com elementos reguladores exógenos. Os genes nativos do caminho podem incluir um ou mais genes de PPC, PYC, AAT, BAAT, e/ou 3-HPDH.

[0310] Alternativamente, um ou mais dos genes 3-HP expressos podem ser derivados de uma fonte de gene que não é nativa para a célula hospedeira. Por exemplo, onde a célula hospedeira de levedura é *I. orientalis*, a célula pode ser engendrada para expressar um ou mais genes não nativos da PYC tais como um gene de PYC de *R. sphaeroides* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 3, um gene de PYC de *R. etli* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 4, um gene de PYC de *P. fluorescens* que codifica a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 5 ou 6, um gene de PYC de *C. glutamicum* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 7, ou um gene de PYC de *S. meliloti* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8; um ou mais genes de PPC não nativos tais como um gene de PPC da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 10, um gene de PPC de *M. thermoautotrophicum* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 11, ou um gene de PPC de *C. perfringens* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 12; um ou mais genes de AAT não nativos tais como um gene aspC da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 16 ou um gene de AAT2 da *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 15;

um ou mais genes de ADC não nativos tais como um gene panD de *S. avermitilis* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 17 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 130, 145, 146, ou 147), um gene panD de *C. acetobutlicum* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 18 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 131), um gene de ADC de *H. pylori* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 133 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 132), um gene de ADC de *Bacillus sp. TS25* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 135 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 134), um gene de ADC de *C. glutamicum* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 137 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 136), ou um gene de ADC de *B. licheniformis* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 139 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 138, 148, 149, 150, ou 151); um ou mais genes BAAT ou gabTs não nativos tais como um gene pyd4 de *S. kluyveri* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 142), um gene de BAAT de *S. avermitilis* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 22 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 140), um gene de gabT de *S. avermitilis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 23, ou um gene UGA1 de *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 24 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 141); um ou mais genes da 3-HPDH não nativos tal como um

gene *ydfG* da *E. coli* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 27 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 143) ou um gene YMR226C de *S. cerevisiae* que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 129 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 144); um ou mais genes da malonato semialdeído redutase não nativo tal como um gene de malonato semialdeído redutase de *M. sedula* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 29 (e/ou que compreende a região codificadora da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 343); um ou mais genes de HIBADH não nativos tais como um gene M3A de *A. faecalis* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 28, um gene KT2440 ou E23440 *mmsB* de *P. putida* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 30 ou SEQ ID NO: 31, respectivamente, ou um gene PAO1 *mmsB* de *P. aeruginosa* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 32; e/ou um ou mais genes da 4-hidroxibutirato desidrogenase não nativos tais como um gene H16 *4hbd* de *R. eutropha* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 33 ou um gene DSM 555 *hbd* de *C. kluyveri* que codifica a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 34.

Exemplo 3A-0: Ensaios de atividade enzimática para cepas de levedura modificadas que expressam os genes do caminho da aspartato/malonato semialdeído

Preparação de extratos isentos de célula brutos (CFE) para ensaios de enzima:

[0311] As células aqui indicadas de culturas de frasco agitado ou biorreator foram coletadas pela centrifugação, o sobrenadante descartado, e a pelota de célula armazenada a -80° C como descrito acima. Para a preparação de CFE, as pelotas de células foram descongeladas, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e mais uma vez coletadas

pela centrifugação. O sobrenadante foi descartado e a pelota de célula foi recolocada em suspensão em um volume aproximadamente igual de tampão de lise contendo 1% de Coquetel de Inibidor de Protease, P8215 da Sigma) em tubos de microcentrífuga de 2,0 ml. Aproximadamente 300 µL de pérolas de zircônia de 0,5 mm (BioSpec) foram adicionadas, e a lise de célula foi realizada no rompedor FastPrep®-24 (MP Biomedicals) por 3 rodadas no ajuste de 6 / 20 segundos. Os tubos de amostra foram esfriados em gelo por 5 minutos entre cada rodada. Depois da lise, as amostras foram centrifugadas na velocidade máxima em uma microcentrífuga por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 1,5 ml frescos e mantidos em gelo. As concentrações de proteína total nos lisados foram determinadas usando o reagente de ensaio de proteína Bio-Rad (ensaio Bradford) e albumina sérica bovina como o padrão, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Atividade de Piruvato Carboxilase (PYC):

[0312] A atividade de piruvato carboxilase em CFE das células aqui indicadas foi determinada como segue. Uma solução de mistura de reação de estoque foi preparada que, quando combinada com CFE na mistura de reação de ensaio, fornece a concentração final que segue dos componentes: Tris (pH 8,0), 100 mM; NaHCO₃, 10 mM; MgCl₂, 5 mM; NADH, 0,2 mM; ATP, 1 mM; acetil CoA, 1 mM; piruvato, 1 mM; biotina (se requerida pela enzima PYC que é ensaiada), 5 µM; malato desidrogenase de coração de bovino, 0,02 unidades/ml. 270 µL desta mistura foram adicionados aos reservatórios de uma placa microtituladora de 96 reservatórios e 30 µL de um CFE apropriadamente diluídos foram adicionados para iniciar a reação. O consumo de NADH foi monitorado a 340 nm usando uma leitora de placa SpectraMax 340 PC. A atividade de piruvato carboxilase é expressa como nmoles de NADH consumidos/s/mg de proteína.

Atividade de Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PPC):

[0313] A atividade de Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PPC)

em CFE pode ser determinada como segue. Uma solução de mistura de reação de estoque é preparada que, quando combinada com CFE na mistura de reação de ensaio, fornece a concentração final que segue dos componentes: Tris (pH 8,0), 100 mM; NaHCO₃, 10 mM; MgCl₂, 5 mM; NADH, 0,1 mM; acetil CoA, 0,5 mM; fosfoenolpiruvato, 3,3 mM; malato desidrogenase de coração bovino (ou coração porcino), 0,02 unidades/ml. 270 µL desta mistura são adicionados aos reservatórios de uma placa microtituladora de 96 reservatórios e 30 µL de um CFE apropriadamente diluído é adicionado para iniciar a reação. O consumo de NADH é monitorado a 340 nm usando um leitora de placa SpectraMax 340 PC.

Atividade de Aspartato Aminotransferase (AAT):

[0314] A atividade de aspartato aminotransferase em CFE das células aqui indicadas foi determinada como segue. Uma solução de mistura de reação de estoque foi preparada que, quando combinada com CFE na mistura de reação de ensaio, fornece a concentração final que segue dos componentes: 100 mM de Tris (pH 8,0), 100 mM; NaHCO₃, 10 mM; MgCl₂, 5 mM; NADH, 0,1 mM; aspartato, 1 mM; α-cetoglutarato, 1 mM; e malato desidrogenase, 0,02 unidades/ml. Em algumas ensaios, a mistura de reação de estoque também conteve piridoxal 5'-fosfato (0,1 mM). 270 µL desta mistura foram adicionados aos reservatórios de uma placa microtituladora de 96 reservatórios e 30 µL de um CFE apropriadamente diluído foi adicionado para iniciar a reação. O consumo de NADH foi monitorado a 340 nm usando uma leitora de placa SpectraMax 340 PC. A atividade de aspartato aminotransferase é expressa como nmoles de NADH consumidos/s/mg de proteína.

Atividade de Aspartato descarboxilase (ADC):

[0315] A atividade de aspartato descarboxilase em CFE das células aqui indicadas foi determinada como segue. 165 µL de tampão de NH₄Ac 100 mM (pH 6,8), e 25 µL de aspartato a 80 mM foram adicionados a cada reservatório de uma placa microtituladora de 96 reservatórios controlada

com termostato a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de CFE. Em intervalos de tempo diferentes (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 minutos), 20 µL de amostra foram retirados da mistura de reação e adicionados a 180 µL de tampão de extinção (2% de ácido fórmico mais 2 mg/L de β-Alanina rotulada com ¹³C como padrão interno). Depois da filtração, a β-Alanina na amostra foi analisada pela LC/MS/MS. As inclinações foram obtidas de plotagens de β-Alanina vs tempo. A atividade foi calculada pela divisão da inclinação pela concentração de proteína celular total na reação. A atividade de ADC é expressa como µmoles de β-alanina formados/s/g de proteína.

[0316] Um ensaio de ADC modificado foi usado em alguns experimentos. Nestes casos, a atividade de ADC em CFE das células aqui indicada foi determinada como segue. 110 µL de tampão de NH₄Ac 100 mM (pH 7,6), e 80 µL de aspartato a 25 mM (depois neutralizando com NaOH) foram adicionados a cada reservatório de uma placa microtituladora de 96 reservatórios controlada com termostato a 40°C. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de CFE. Em intervalos de tempo diferentes (2, 4, 6, 8, 10 minutos), 20 µL de amostra foram retirados da mistura de reação e adicionados a 180 µL de tampão de extinção (2% de ácido fórmico com 2 mg/L de β-Alanina rotulada com ¹³C como padrão interno ou extinto em ácido fórmico a 2% e depois transferido 1:10 em 20% de metanol/80% de água com 2 mg/L de β-Alanina rotulado com ¹³C como padrão interno). Depois da filtração, a β-Alanina na amostra foi analisada pela LC/MS/MS. As inclinações foram obtidas das plotagens de β-Alanina vs tempo. A atividade foi calculada pela divisão da inclinação pela concentração de proteína celular total na reação. A atividade de ADC é expressa como µmoles de β-alanina formados/s/g de proteína.

atividade de β-alanina aminotransferase (BAAT):

[0317] A atividade de β-Alanina aminotransferase (BAAT) em CFE foi determinada como segue. 190 µL de uma mistura de reação contendo 100 mM de NH₄HCO₃ (pH 7,6), 8 mM de α-cetoglutarato, 0,5 mM

de acetil-CoA, 0,1 mM de piridoxal-5'-fosfato, e 200 mM de β -alanina foram adicionados a uma placa microtituladora de 96 reservatório na temperatura ambiente. A reação foi iniciada pela adição de 10 μ L de CFE. As amostras, de 20 μ L cada, foram tomadas a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, e 20 minutos e adicionadas a 75 μ L de tampão de extinção (2,5% de ácido fórmico). As amostras foram neutralizadas e o pH controlado pela adição de 5 μ l de NaOH a 10 M e 50 μ l de NaCO₃ a 100 mM (pH 10). As amostras filtradas foram derivatizadas pela mistura, na injeção, com o reagente OPA (*o*-ftaldialdeído), 10 mg/ml (Agilent Technologies 5061-3335). Glutamato derivatizado com OPA foi quantificado depois da separação com a HPLC pela detecção de fluorescência (excitação a 340 nm; emissão a 460 nm). As amostras de 15 μ L foram injetadas em uma coluna Gemini C18 de fase reversa analítica com 5 μ m de empacotamento (Phenomonex 150 x 4,6 mm). A coluna foi equilibrada em 62,5% de tampão de fosfato a 20 mM (pH 7,8) (A) e 37,5% de metanol (B). Os gradientes lineares foram como segue: elevação para 40% de B, 0 a 0,3 min; 40% de B, 0,3 a 1 min; elevação para 85% de B, 1 a 1,75 min; 85% de B, 1,75 a 2,25 min; elevação para 37,5%, 2,25 a 3 min; 37,5% de B, 3 a 4 min. A taxa de fluxo foi de 2 ml/min. As curvas padrão de glutamato em tampão de reação foram usadas para determinar a concentração das amostras. As inclinações foram obtidas de plotagens de [glutamato] vs tempo. A atividade foi calculada pela divisão da inclinação com concentração de proteína celular total na reação.

Atividade de 3-HP desidrogenase (3-HPDH):

[0318] A atividade de 3-HP desidrogenase em CFE das células aqui indicadas foi determinada como segue. 190 μ L de CFE diluído (tipicamente uma diluição 100X) em 100 mM de NH₄HCO₃ (pH 7,6) e NADPH foram adicionados a cada reservatório de uma placa microtituladora de 96 reservatórios controlada com termostato a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 10 μ L de malonato semialdeído a 60 mM (MSA, recém-preparado em 10 mM de H₂SO₄ de solução de estoque de 200 mM de MSA em

10 mM de H_2SO_4). As amostras, de 20 μL cada, foram tiradas a 1, 2, 4, 6, 8, 10, e 12 minutos, e extintas em 80 μL de água fervente. Depois de esfriar, misturar 75 μL de mistura extinta com 75 μL de tampão contendo 2 mM de NH_4Ac (pH 6,8) e 3 mg/L de 3-HP rotulado com ^{13}C . Depois da filtração, 3-HP na amostra foi quantificado pela LC/MS/MS. As inclinações foram obtidas de plotagens de 3-HP vs o tempo. A atividade foi calculada pela divisão da inclinação pela concentração de proteína celular total na reação. A atividade de 3-HP desidrogenase é expressa como nmoles de NADPH formados/s/mg de proteína.

[0319] Um ensaio de 3-HPDH modificado foi usado em alguns experimentos. Nestes casos, a atividade de 3-HPDH em CFE das células aqui indicadas foi determinada como segue. A redução da malonato semialdeído foi medida seguindo-se o desaparecimento do NADPH com o tempo a 340 nm. O malonato semialdeído foi sintetizado internamente de acordo com o protocolo desenvolvido por Yamada e Jacoby (Yamada, E. W., Jacoby, W. B., 1960, Direct conversion of malonic semialdehyde to acetyl-coenzyme A, Journal of Biological Chemistry, Volume 235, Número 3, pp. 589-594). O ensaio foi conduzido em uma microplaca de 96 reservatórios, e o volume final foi de 200 μL . A reação foi iniciada pela adição de 30 μL de CCE em 170 μL de tampão de ensaio (malonato semialdeído 2 mM, 100 mM de Tris pH 8,0 e 0,5 mM de NADPH). A absorbância a 340 nm foi seguida em uma leitora de microplaca (Spectra Max 340PC, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA) por 10 minutos na temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Uma unidade de atividade de 3-HPDH é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de NADPH em um minuto na presença de malonato semialdeído.

Exemplo 3A-1: Vetores de inserção para a expressão da aspartato descarboxilase (ADC) no local adh1202

[0320] Vários genes da aspartato descarboxilase foram otimizados no códon para a expressão em *I. orientalis* e sintetizado pela

GeneArt® (Burlingame, CA, USA) resultante nos plasmídeos listados na Tabela 7. Os genes sintéticos chegaram ao vetor pMA-T e podem ser evocados a partir do vetor por intermédio da digestão de restrição *XbaI* e *PacI*. O fragmento de restrição pode ser depois clonado dentro do mesmo sítio no pMIBa107 colocando o gene sob o controle do promotor e terminador PDC, e deixando a integração ocorrer no local *adh1202* de *I. orientalis*.

Tabela 7: Construções de Transformante

plasmídeo de construção	fonte de gene	número de gene	SEQ ID do gene	construção de integração	transformante
1051387	<i>Helicobacter pylori</i>	P56065	132	pWTY10-0033-1	yWTY1-1 yWTY1-2
1051391	<i>Bacillus sp. TS25</i>	ZY440006.gene3	134	pWTY10-0033-2	yWTY1-5 yWTY1-6
1051389	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Q9X4N0	136	pWTY10-0033-3	yWTY1-9 yWTY1-10
1051388	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	P58285	131	pWTY10-0033-4	yWTY1-13 yWTY1-14
1051390	<i>Bacillus licheniformis</i>	Q65158	138	pWTY10-0033-5	yWTY1-17 yWTY1-18
1045172	<i>Streptomyces avermitilis</i>		130	pWTY10-0033-7	yWTY1-25 yWTY1-26

[0321] Os plasmídeos 1045172, 105387, 105388, 105389, 105390, e 105391 foram digeridos com *XbaI* e *PacI* e conduzidos em um gel de agarose a 1,3% usando tampão TBE. Os fragmentos de 400 a 500 pares de base de cada digestão correspondente ao gene de ADC (*panD*) foram excisados do gel e extraídos da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen).

[0322] O plasmídeo pMIBa107 foi digerido com *XbaI* e *PacI*, tratado com de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) e a faixa de vetor purificada depois da eletroforese em gel de agarose em tampão TBE. Os fragmentos de *panD* digeridos com *XbaI* e *PacI* foram ligados neste vetor pMIBa107 purificado usando T4 DNA ligase e um kit de ligação Quick (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de ligação foram transformados em células XL10-GOLD ULTRA (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+ amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vinte e quatro transformantes de cada

reação foram escolhidos para placas 2X YT + amp. O Mini-prep DNA de quatro de cada um dos transformantes resultantes foi triado pela digestão com *ApaI*, *NcoI* e *SacI*. Os clones que produzem os tamanhos de faixa desejados foram confirmados ser corrigidos pelo sequenciamento de DNA e foram designados como mostrado na Tabela 7. Os plasmídeos resultantes permitem a integração de cada gene de ADC no local *adh1202* com o cassete de expressão orientado na direção avançada.

[0323] Aproximadamente 10 µg de cada uma de cada construção de integração foram digeridos com *ApaI* e *KpnI* e conduzidos em um gel de agarose a 1% usando 89 mM de tampão Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Os fragmentos de aproximadamente 4450 pares de base para cada plasmídeo foram excisados do gel e extraídos usando o kit de extração em gel QIAquick (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração dos produtos purificados foi descoberta estar entre 39 e 138 ng/ul. 0,39 a 1,4 µg dos fragmentos das construções de integração (digerido com *ApaI* e *Kpn I*) foram transformados em CNB1 de *I. orientalis* como descrito acima. Os transformantes foram plaqueados em meio de seleção ura e incubados a 37°C, novamente riscados em meio de seleção ura, e incubados a 37°C durante a noite. O DNA genômico foi preparado a partir de colônias URA3+ e checado pela PCR para confirmar a integração. Os iniciadores 0611718 e 0611632 foram usados para amplificar um fragmento de 2,5 kbp para confirmar a integração. Cada reação de PCR conteve 2,5 µL de DNA genômico, 12,5 pM de cada um dos iniciadores 0611718 e 0611632, Tampão de Reação 1X Crimson Taq® (New England Biolabs), 0,2 mM de mistura de dNTP, 0,625 Unidades de DNA polimerase Crimson Taq® (New England Biolabs) em um volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado por 1 ciclo a 95°C por 30 segundos; 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30

segundos, e 68°C por 3 minutos; e 1 ciclo a 68°C por 10 minutos.

[0324] Dois transformantes confirmados em URA3+ para cada construção foram designados como mostrado na Tabela 7. Estas cepas são heterozigotas no adh1202 quanto ao gene de ADC indicado com expressão direcionada pelo promotor e terminador PDC de *I. orientalis*.

[0325] A expressão de PanD e a atividade de enzima das cepas listadas na Tabela 7 (e cepa MBin500, supra, como controle negativo) foram testadas. As culturas durante a noite de cada cepa foram cultivadas durante a noite em YPD ON a 37°C, diluído 1:50 em 25 ml de YPD fresco em frasco provido de septo de 125 ml a 37°C, e cultivado a uma OD₆₀₀ ~2 a 8. As pelotas de célula foram depois usadas para preparar CFE, que foi depois ensaiada quanto à atividade de ADC como descrita *supra*. Os resultados representativos são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Fonte de Gene ADC	Seq ID No do Gene	Atividade de ADC
MBin500 (controle)	N/A	N/A	0
yWTY1-1 yWTY1-2	<i>Helicobacter pylori</i>	132	0
yWTY2-5 yWTY2-6	<i>Bacillus sp. TS25</i>	134	0,31 0,15
yWTY3-9 yWTY3-10	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	136	0,31 0,19
yWTY4-13 yWTY4-14	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	131	0,37 0,23
yWTY5-17 yWTY5-18	<i>Bacillus licheniformis</i>	138	0,56 0,61
yWTY7-25 yWTY7-26	<i>Streptomyces avermitilis</i>	130	0,23 0,30

[0326] Em seguida, versões homozigotas de yWTY5-17 e yWTY7-25 foram criadas. Primeiro, derivados ura yWTY5-17 e yWTY7-25 foram isolados como descrito acima. O DNA genômico foi preparado a partir de colônias resistentes a FOA e checadas pela PCR como descrito acima para confirmar a perda do marcador selecionável URA3. Iniciadores 0611718 e

0611632 foram usados para amplificar um fragmento de 2,4 kbp para a integração com o marcador ura presente e fragmento de 1100 pares de base na ausência do marcador ura. As cepas de ura de yWTY5-17 e yWTY7-25 que produziram um fragmento de PCR de 1100 pares de base com os iniciadores 0611718 e 0611632 foram designadas MIBa331 e MIBa332, respectivamente.

[0327] 10 µg de cada um de pWTY10-0033-5 e pWTY10-0033-7 foram digeridos com *Apa*I, *Kpn*I, e *Nco*I e conduzidos em um gel de agarose a 1% usando 89 mM de tampão de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Fragmentos de aproximadamente 4450 pares de base para cada plasmídeo foram excisados do gel e extraídos usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen). Os fragmentos purificados de pWTY10-0033-5 e pWTY10-0033-7 foram transformados em MIBa331 e MIBa332, respectivamente como descrito acima. Os transformantes foram plaqueados em meio de seleção ura e incubados durante a noite a 37°C, e depois, novamente riscados em meio de seleção ura e incubados a 37°C durante a noite. O DNA genômico foi preparado e PCRs Crimson *Taq*® foram conduzidas para confirmar a integração como descrito acima. Os iniciadores 0611718 e 0611632 amplificam um fragmento de 2,4 kbp para a integração com o marcador ura presente, e amplificam um fragmento de 1100 pares de base na ausência do marcador ura. Os transformantes de MIBa331 e MIBa332 que produziram fragmentos de PCR de 1100 pares de base e 2,4 kbp com iniciadores 0611718 e 0611632 foram salvos e designados MIBa338 e MIBa337, respectivamente. MIBa337 é homozigoto para o gene de ADC de *S. avermitilis* nos locais adh1202 e MIBa338 é homozigoto para o gene de ADC de *B. licheniformis* ao nível dos locais adh1202. Ambas as cepas têm o controle do respectivo gene de ADC sob o promotor e terminador PDC de *I. orientalis*.

[0328] A expressão de ADC e atividade de enzima das cepas homozigotas panD MIBa337 e MIBa338 foram comparadas com as

cepas *panD* heterozigotas *yWTY5-17* e *yWTY7-25*. As culturas foram cultivadas em YPD durante a noite a 37°C, e depois diluídas 1:50 em 25 ml de YPD fresco em frascos providos de septo de 125 ml a 37°C e cultivadas em uma OD_{600} ~2 a 8. A pelota de células foi usada para preparar CFE, que foi depois ensaiada quanto à atividade de ADC como descrito acima. Os resultados representativos para dois experimentos independentes são mostrados na Tabela 9A.

Tabela 9A: Dados de Atividade de Enzima Transformante

Cepa	Fonte de Gene panD	tipo de alelo	Seq ID NO do Gene	Atividade de ADC (Exp. 1, Exp. 2)
MBin500 (controle)	N/A	N/A	N/A	0, 0
yWTY5-17	<i>Bacillus licheniformis</i>	heterozigoto	138	0,6, 0,29
MIba338	<i>Bacillus licheniformis</i>	homozigoto	138	0, 0,22
yWTY7-25	<i>Streptomyces avermitilis</i>	heterozigoto	130	0,19, 0,13
MIba337	<i>Streptomyces avermitilis</i>	homozigoto	130	0,28, 0,19

[0329] Os resultados de um terceiro experimento independente para comparar a atividade de ADC em CFE preparado a partir das cepas MIba337 e MIba338 são mostrados na Tabela 9B.

Tabela 9B: Dados de Atividade de Enzima Transformante

Cepa	Fonte de Gene panD	tipo de alelo	Seq ID No do Gene	Atividade de ADC
MBin500 (controle)	N/A	N/A	N/A	0
yWTY5-17	<i>Bacillus licheniformis</i>	heterozigoto	138	0,218
MIba338	<i>Bacillus licheniformis</i>	homozigoto	138	0,453
yWTY7-25	<i>Streptomyces avermitilis</i>	heterozigoto	130	0,087
MIba337	<i>Streptomyces avermitilis</i>	homozigoto	130	0,188

[0330] A análise de SDS-PAGE das amostras acima indicou que a expressão de panD a partir de MIba338 foi a mais alta dentre estas cepas.

[0331] As cepas MBin500, MIba337 e MIba338 foram avaliadas em biorreatores para a produção de 3-HP, usando o método aqui descrito. A cepa de controle MBin500 não produziu nenhum 3-HP detectável (média de duas fermentações independentes). A cepa MIba337 produziu 1,33 g/L de 3-HP (uma fermentação realizada) e a cepa MIba338 produziu 3,15 g/L de 3-HP (média de três fermentações independentes). As fermentações individuais das cepas MIba337 e MIba338 foram comparadas ainda com respeito ao seu desempenho de produção de 3-HP e atividade de ADC (Tabela 10). De modo a considerar diferenças na massa de célula nestas fermentações, o desempenho de produção de 3-HP é relatado na Tabela 10 como concentração de 3-HP por unidade de massa de célula (expressa como [g/L de 3-HP]/[g/L de peso de célula seca]). Os resultados mostram a atividade de ADC melhorada e desempenho de produção de 3-HP quando do uso do gene

panD de *Bacillus licheniformis* (cepa MIBa338) vs. o gene panD de *Streptomyces avermitilis* (cepa MIBa337).

Tabela 10: Desempenho de produção de 3-HP e atividade de ADC em cepas MIBa337 e MIBa338

Tempo de fermentação (horas)	MIBa337		MIBa338	
	Atividade de ADC (mmol/min/g de prot)	3HP/DCW	Atividade (mmol/min/g de prot)	3HP/DCW
11	0,005	0,00	0,021	0,024
22	0,011	0,05	0,055	0,131
31	0,003	0,04	0,029	0,159
48	0,001	0,05	0,018	0,142

Exemplo 3A-2: Vetores de inserção para expressar β -alanina aminotransferase (BAAT) ou ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local adh1202

[0332] *I. orientalis* otimizado no códon versão de BAAT de *S. avermitilis*, UGA1 de *S. cerevisiae*, PYD4 de *S. kluyveri*, YMR226c de *S. cerevisiae*, e *ydfG* da *E. coli* foram sintetizados pela GeneArt® resultando nos plasmídeos listados abaixo. Os genes sintéticos chegaram ao vetor pMA-T e podem ser evocados do vetor por intermédio de digestão usando *Xba*I e *Pac* I. O fragmento digerido pode ser depois clonado dentro dos mesmos sítios em pMIBa107, colocando o gene sob o controle do promotor e terminador PDC e deixando a integração ocorrer no local adh1202.

Tabela 11: Construções de Transformante

Plasmídeo de Construção	Gene	fonte de gene	SEQ ID NO	construção de integração	transformante
1045169	gabT (UGA1)	<i>S. cerevisiae</i>	141	pMIBa122	MIBa310
1045170	BAAT	<i>S. avermitilis</i>	140	pMIBa121	MIBa309
1045171	BAAT (PYD4)	<i>S. kluyveri</i>	142	pMIBa124	MIBa312
1045173	3-HPDH (YMR226c)	<i>S. cerevisiae</i>	144	pMIBa123	MIBa311
1045168	3-HPDH (<i>ydfG</i>)	<i>E. coli</i>	143	pMIBa120	MIBa308

[0333] Os plasmídeos 1054168, 1054169, 1054170, 1054171, 1054172, e 1054173 foram digeridos com *Xba*I e *Pac*I e conduzidos em um gel de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Fragmentos de 761 (*ydfG*) pares de base de 1045168, 1430 (UGA1) pares de base de 1045169, 1370

(BAAT) pares de base de 1045170, 1442 (PYD4) pares de base de 1045171, ou 814 (YMR226c) pares de base de 1045173 foram excisados do gel e extraídos da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen). O plasmídeo pMIBa107 foi digerido com *Xba*I e *Pac*I seguido pelo tratamento com CIP resultante em um fragmento linear de 7,9 kbp. A digestão foi purificada usando um Kit de Purificação de PCR QIAQUICK® (Qiagen). Os fragmentos digeridos de ydfG, UGA1, BAAT, PYD4, ou YMR226c foram depois ligados em pMIBa107 (digerido com *Xba*I e *Pac*I e tratado com CIP) usando T4 DNA ligase como aqui descrito. Os produtos de ligação foram transformados em células *E. coli* One Shot® TOP10 quimicamente Competentes (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+ amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados pela digestão com *Xba*I e *Pac* I. Os clones que produzem os tamanhos de faixa desejados foram confirmado estar corretos pelo sequenciamento de DNA e designado pMIBa120, pMIBa121, pMIBa122, pMIBa123, e pMIBa124 para ydfG, BAAT, UGA1, YMR226c, ou PYD4, respectivamente. Os plasmídeos resultantes permitem a integração do gene desejado no local adh1202 com o cassete de expressão orientado na direção avançada.

[0334] As construções de integração na Tabela 11 foram usadas para integrar os genes de interesse otimizados no códon para a expressão em *I. orientalis* dentro do local adh1202 sob o controle do promotor e terminador PDC. O cassete de expressão também contém um marcador selecionável URA3 para permitir a seleção de transformantes dentro de um hospedeiro ura como aqui descrito. Os cassetes de expressão e regiões de homologia adh1202 são flanqueados pelos sítios de restrição *Apa*I e *Kpn*I para permitir a liberação do fragmento do plasmídeo.

[0335] 15 µg de cada uma das construções de integração na Tabela 11 foram digeridos com *Apa*I, *Kpn*I, e *Nco*I e conduzidos em um gel

de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). A digestão com *Nco*I rompe a cadeia principal do vetor e torna mais fácil extrair o fragmento de interesse do gel de agarose. Fragmentos de 4884 pares de base, 5493 pares de base, 5553 pares de base, 4937 pares de base, e 5565 pares de base de pMIBa120, pMIBa121, pMIBa122, pMIBa123, e pMIBa124, respectivamente, foram excisados do gel e extraídos da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen). A concentração dos produtos purificados foi descoberta estar entre 80 e 120 ng/μL. 0,8 a 1,2 μg dos fragmentos de restrição de pMIBa120-4 foram transformados em CNB1 (ura) de *I. orientalis* como aqui descrito. Os transformantes depois foram plaqueados em meio de seleção de ura e cultivados na temperatura ambiente por 60 horas. Os transformantes foram novamente riscados em meio de seleção de ura e incubados a 37°C durante a noite.

[0336] Vários transformantes de cada um foram checados pela PCR de colônia para confirmar a integração. A integração correta foi confirmada pelo uso de pares de iniciador que checam as extremidades 5' e 3' das integrações e são listados abaixo. O iniciador 0611717 recoze no promotor PDC na direção reversa, enquanto que o iniciador 0611225 recoze no marcador selecionável URA3 na direção avançada. Os iniciadores 0611631 e 0611632 recozem fora do sítio de integração que vai às direções avançada e reversa, respectivamente; os iniciadores 0611717 e 0611631 amplificam um fragmento de 976 pares de base em integrantes corretos; os iniciadores 0611225 e 0611632 amplificam um fragmento de 1,4 kbp nos integrantes corretos; e os iniciadores 0611631 e 0611632 amplificam um fragmento de 2,7 kbp indicando um cromossoma do tipo selvagem e amplificarão os fragmentos de ~5 kbp para integrações. Para criar DNA genômico, uma colônia de cada transformante foi incubada em 50 μL de 0,05 U/μL de liticase (Sigma, St. Louis, MO, USA) em TE a 37°C por 30 minutos,

seguido pela incubação a 95°C por 10 minutos. As PCRs foram conduzidas como aqui descrito para confirmar a integração. Um transformante de cada integrante heterozigoto que produziu fragmentos de PCR de 976 pares de base com 0611717 e 0611631, 1,4 kbp com 0611225 e 0611632, e 2,7 kbp com 0611631 e 0611632 foi salvo e designado MIBa308, MIBa309, MIBa310, MIBa311, e MIBa312 como mostrado na Tabela 11.

[0337] As culturas dos transformantes MIBa308, MIBa309, MIBa310, MIBa311, e MIBa312 foram cultivadas durante a noite em YPD a 37°C. As culturas foram depois diluídas 1:50 em 25 ml de YPD fresco em frasco provido de septo de 125 ml a 37°C e cultivadas a uma OD₆₀₀ ~4 a 10. As amostras das células foram analisadas quanto a expressão de proteína pela SDS-PAGE usando os métodos aqui descritos. CFE foi também preparado a partir de pelotas de células da cultura, e a atividade de 3HP desidrogenase foi medida em CFE usando o método aqui descrito. A expressão de UGA1 e PYD4 de cepas MIBa310 e MIBa312, respectivamente, foi detectada pela SDS-PAGE pelo aparecimento de uma faixa de ~53 KDa que foi ausente nas cepas não integradas para cada gene. A expressão de BAAT em MIBa309 não foi detectada pela SDS-PAGE sob estas condições. A Tabela 12A mostra a atividade de 3-HP desidrogenase (3-HPDH) no CFE das cepas.

Tabela 12A: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Gene superexpresso	fonte de gene	SEQ ID NO do Gene	atividade de 3-HPDH
MIBin500	N/A	N/A	N/A	0,28, 0,24
MIBa310	gabT (UGA1)	<i>S. cerevisiae</i>	141	0,39
MIBa309	BAAT	<i>S. avermitilis</i>	140	0,39
MIBa312	BAAT (PYD4)	<i>S. kluyveri</i>	142	0,45
MIBa311	3-HPDH (YMR226c)	<i>S. cerevisiae</i>	144	1,1
MIBa308	3-HPDH (ydfG)	<i>E. coli</i>	143	0,67

[0338] Em um experimento independente usando condições de ensaio melhoradas, a atividade de BAAT em CFE preparada a partir das

cepas MBin500 (controle), MlBa310, MlBa309 e MlBa312 foi comparada. Os resultados deste experimento são mostrados na Tabela 12B.

Tabela 12B: Dados de atividade de enzima transformante.

Cepa	Gene superexpresso	fonte de gene	SEQ ID NO do Gene	atividade de BAAT
MBin500	N/A	N/A	N/A	0,67
MIBa310	gabT (UGA1)	<i>S. cerevisiae</i>	141	9,05
MIBa309	BAAT	<i>S. avermitilis</i>	140	0,42
MIBa312	BAAT (PYD4)	<i>S. kluyveri</i>	142	105,85

[0339] Os plasmídeos pMIBa120-4 (*supra*) contêm sítios de restrição *NotI* que flanqueiam o cassete de expressão como segue: promotor PDC, gene de interesse (BAAT ou 3-HPDH), terminador PDC, e o marcador de seleção URA3. A homologia para a integração no local *adh1202* é fora dos sítios de restrição *NotI*. Estes plasmídeos todos têm o cassete de expressão na orientação avançada.

[0340] Novos plasmídeos foram construídos com o cassete de expressão orientado na direção reverse para permitir facilidade de triagem de cepas de integração homozigota. Os plasmídeos pMIBa120-4 foram digeridos com *NotI* e conduzidos em um gel de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Fragmentos de 3,5 kbp (pMIBa120), 4,2 kbp (pMIBa121), 4,2 kbp (pMIBa122), 3,5 kbp (pMIBa123), e 4,2 kbp (pMIBa124) foram excisados do gel e extraídos da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen). Cada um destes fragmentos foi ligado dentro do pHJJ76-no ura tratado com *NotI*/CIP linear de 5,2 kbp usando T4 DNA ligase como aqui descrito. Os produtos de ligação foram transformados em células da *E. coli* Quimicamente Competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+ amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados pela digestão com *XbaI* e *KpnI*. Os clones que produzem os tamanhos de faixa desejados foram designados pMIBa131, pMIBa132, pMIBa133, pMIBa134, e pMIBa135 para UGA1, YMR226c, PYD4, ydfG, e BAAT, respectivamente. Os plasmídeos

resultantes permitem a integração do gene desejado no local *adh1202* com o cassete de expressão orientado na direção reversa.

[0341] Derivados Ura de MIBa308-12 foram isolados como aqui descritos. Várias colônias resistentes a FOA para MIBa308-12 foram purificadas em colônia duas vezes pelo cultivo em placas YPD 37°C. O DNA genômico foi preparado a partir de colônias resistentes a FOA e checadas pela PCR para confirmar a perda de marcador selecionável URA3 como aqui descrito. Os iniciadores 0611631 e 0611632 recozem fora do sítio de integração que vai às direções avançada e reversa, respectivamente. O iniciador 0611718 recoze no terminador PDC a montante do marcador selecionável ura; os iniciadores 0611632 e 0611631 amplificam um fragmento de 2,7 kbp para um cromossoma do tipo selvagem; e os iniciadores 0611718 e 0611632 amplificam um fragmento de 2,4 kbp para uma integração com o marcador ura presente e fragmento de 1100 pares de base na ausência do marcador ura. Uma cepa ura de MIBa308-12 que produziu os fragmentos de PCR de 1100 pares de base com 0611718 e 0611632, e 2,7 kbp com 0611631 e 0611632 foi salva e designada MIBa314 (cepa ura de MIBa310), MIBa315 (cepa ura de MIBa312), MIBa316 (cepa ura de MIBa311), MIBa326 (cepa ura de MIBa308), e MIBa328 (cepa ura de MIBa309).

[0342] 10 a 15 µg de cada um de pMIBa131, pMIBa132, pMIBa133, e pMIBa135 foram digeridos com *ApaI*, *KpnI*, e *NcoI* e conduzidos em um gel de agarose a 1% usando tampão 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). A digestão com *NcoI* facilita a extração do fragmento de interesse do gel de agarose. Fragmentos de 5553 pares de base, 4937 pares de base, 5565 pares de base, 5493 pares de base de pMIBa131-3, pMIBa135, respectivamente, foram excisados do gel e extraídos da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen). A concentração dos produtos purificados foi

descoberta estar entre 67 e 80 ng/ μ L. 0,67 a 0,8 μ g dos fragmentos restringidos de pMIBa131-3, e pMIBa135 foram transformados em MIBa314, MIBa316, MIBa315, ou MIBa328 como aqui descritos. Os transformantes foram plaqueados em meio de seleção ura e incubados durante a noite a 37°C, e depois novamente riscados em meio de seleção ura e incubados durante a noite a 37°C durante a noite. O DNA genômico foi preparado a partir de colônias URA3+ e checado pela PCR como aqui descrito para confirmar a integração do segundo cassete de expressão, tornando a cepa homozigota para o gene de interesse. Os iniciadores 0611718 e 0611632 amplificam um fragmento de 1100bp para a primeira integração como descrita acima, e os iniciadores 0611632 e 0611717 amplificam um fragmento de 814 pares de base para a segunda integração na orientação reversa. Transformantes URA3+ de cada linhagem que amplificou um fragmento de 1100 pares de base com 0611718 e 0611632 e um fragmento de 814 pares de base com 0611717 e 0611632 foram designados MIBA317, MIBA318, MIBA319, e MIBa329 (ver a Tabela 13).

Tabela 13: genótipos Transformantes

Cepa	Genótipo
MIBa317	adh1202 Δ ::(PDC _{promo} -Opt.ScYMR226c, URA3Scar)/ adh1202 Δ ::(PDC _{promo} -Opt.ScYMR226c, URA3) ura3-/ura3-
MIBa318	adh1202 Δ ::(PDC _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3Scar)/ adh1202 Δ ::(PDC _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3) ura3-/ura3-
MIBa319	adh1202 Δ ::(PDC _{promo} -Opt.SkPYD4, URA3Scar)/ adh1202 Δ ::(PDC _{promo} -Opt.SkPYD4, URA3) ura3-/ura3-
MIBa329	adh1202 Δ ::(PDC _{promo} -Opt.SaBAAT, URA3Scar)/ adh1202 Δ ::(PDC _{promo} -Opt.SaBAAT, URA3) ura3-/ura3-

[0343] A expressão e atividades de enzima das cepas homozigotas ou heterozigotas para YMR226c, UGA1, PYD4, e BAAT foram determinadas. As culturas durante a noite de MIBA309-12, MIBa317-9 e MIBa329 foram cultivadas em YPD ON a 37°C, e depois diluídos 1:50 em 25 ml de YPD fresco em frasco provido de septo de 125 ml a 37°C e cultivadas a uma OD₆₀₀ ~4 a 10. As amostras das células foram analisadas quanto a expressão da proteína pela SDS-PAGE usando o método aqui descrito. CFE

foi também preparado a partir das pelotas de célula das culturas, e a atividade de 3HP desidrogenase foi medida no CFE usando o método aqui descrito. Com base nos resultados de SDS-PAGE, as cepas MIBa310, MIBa318, MIBa312 e MIBa319 contiveram uma proteína com uma massa de ~53 KDa (p tamanho esperado das proteínas codificadas pelos genes UGA1 ou PYD4). A faixa correspondente a esta proteína não foi observada na análise de SDS-PAGE da cepa MBin500. Além disso, a expressão de UGA1 e PYD4 das cepas homozigotas MIBa318 e MIBa319, respectivamente, foi maior do que as cepas heterozigotas correspondentes MIBa310 ou MIBa312 (como julgado pela análise de SDS-PAGE). A expressão de BAAT não foi detectada (pela SDS-PAGE) em cepas MIBa309 ou MIBa329 sob estas condições. A Tabela 14A mostra a atividade de 3-HP desidrogenase (“3-HPDH”) em CFE das cepas MBin500, MIBa311 e MIBa317.

Tabela 14A: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Gene superexpresso	SEQ ID NO do Gene	fonte	tipo de alelo	atividade de 3-HPDH
MBin500 (control)	N/A	N/A	N/A	N/A	0,13
MIBa311	3-HPDH (YMR226c)	144	<i>S. cerevisiae</i>	heterozigotos	1,49
MIBa317	3-HPDH (YMR226c)	144	<i>S. cerevisiae</i>	homozigotos	2,85

[0344] Em um experimento independente usando condições melhoradas de ensaio, a atividade de BAAT em CFE preparado a partir de cepas MBin500 (controle), MIBa319 e MIBa329 foram comparados. Os resultados deste experimento são mostrados na Tabela 14B.

Tabela 14B: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Gene superexpresso	SEQ ID NO do Gene	fonte	atividade de BAAT
MBin500 (control)	N/A	N/A	N/A	0,67
MIBa319	BAAT (PYD4)	142	<i>S. kluyveri</i>	228,01
MIBa329	BAAT	140	<i>S. avermitilis</i>	0,38

[0345] Derivados de ura das cepas MIBa317, MIBa318, e

MIba319 foram isolados como aqui descrito. Várias colônias resistentes a FOA para MIba317, MIba18, e MIba19 foram purificadas em colônia pelo crescimento em placas YPD a 37°C. O DNA genômico foi preparado a partir de colônias resistentes a FOA e checadas pela PCR como aqui descrito para confirmar a perda de marcador selecionável URA3. Os iniciadores 0611718 e 0611632 amplificam um fragmento de 1100 pares de base indicando a primeira integração como descrita acima, e iniciadores 0611632 e 0611717 amplificam um fragmento de 814 pares de base indicando a presença da segunda integração na orientação reversa. Os iniciadores 0611718 e 0611631 amplificam um fragmento de 2,6 kbp indicando a segunda integração com o marcador ura e um fragmento de 1200 pares de base sem o marcador ura. As cepas ura de MIba317 e MIba318 que produziram fragmentos de PCR de 1100 pares de base com 0611718 e 0611632, 814 pares de base com 0611632 e 0611717, ou 1200 pares de base com 0611718 e 0611631 foram salvos e designados MIba320 e MIba321, respectivamente. Quando o marcador ura foi removido de MIba319 um evento de conversão de gene possível ocorreu resultando em MIba322 como indicado pela PCR (nenhum fragmento de 2,7 kbp com os iniciadores 0611632 e 0611631 ou fragmento de 814 pares de base com 0611632 e 0611717, mas fragmento de 1100 bp amplificado com 0611718 e 0611632) de modo que ambos os cassetes de expressão foram orientados na direção avançada.

Exemplo 3A-3: Construção de fragmentos à esquerda de vetores de inserção para expressar a aspartato 1-descarboxilase (ADC), β -alanina aminotransferase (BAAT), e ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local pdc

Fragmento à esquerda contenda ADC de S. avermitilis (SEQ ID NO: 130) e BAAT de S. avermitilis (SEQ ID NO: 140)

[0346] Para permitir a inserção de um gene para a expressão entre o promotor ENO1 e as regiões terminadoras PDC, o vetor pMhCt068 foi

digerido com *Xba*I e *Pac*I, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 6,1 kbp foi excisada do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0347] O gene de BAAT (pyd4) de *Saccharomyces kluyveri* (SEQ ID NO: 142) foi depois amplificado com iniciadores 0611196 e 0611186 que contêm sítios de restrição para a subclonagem subsequente. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição de 1 para 50 de um mini-prep de plasmídeo contendo o gene pyd4 de *S. kluyveri*, Tampão de amplificação 1X *Pfx* (Invitrogen), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611196 e 0611186, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO e 2,5 unidades de PlatinumR *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 95°C por 2 minutos, seguido por 34 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 40,8°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 1428 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0348] O produto de PCR pyd4 gerado acima foi digerido com *Xba*I e *Pac*I e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 1,4 kbp foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. Este DNA purificado foi clonado dentro do vetor pMhCt068 restringido por *Xba*I e *Pac*I descrito acima em

uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 100 ng de vetor pMhCt068 XbaI/PacI, 70,5 ng de inserto pyd4 *Xba I/PacI*, e 1 µL de DNA ligase Quick T4 (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min. à temperatura ambiente, e depois esfriada em gelo. 5 µL desta reação foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *XbaI* e *PacI* como aqui descritos, com um isolado verificado designado “esquerdo+pyd4#1”.

[0349] Um polinucleotídeo que codifica a ADC de *S. avermitilis* da SEQ ID NO: 17 e otimizada no códon para a expressão na *E. coli* foi amplificado com os iniciadores 0611376 e 0611377 (note que o iniciador 0611376 resulta na remoção da base “T” na extremidade 5’ do sítio de restrição *NheI* a seguir da inserção por intermédio de In-Fusion dentro de pMhCt068, que remove um códon de partida ATG não desejado presente no clone pMhCt068 inicial). A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição 1 para 50 de um mini-prep de plasmídeo contendo o gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado para a *E. coli*, Tampão de Reação 1X ThermoPol (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611376 e 0611377, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 2 µL de MgSO₄ a 100 mM, e 2 unidades de Vent_R[®] (exo-) DNA polimerase (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 94°C por 2 minutos, seguido por 34 ciclos cada um a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde

um produto de PCR de aproximadamente 420 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0350] O plasmídeo “esquerdo+pyd4#1” depois foi digerido com *NheI* e *AscI*, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 7,5 kbp foi excisada do gel e purificado usando um kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de PCR purificado acima contendo o gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado para *E. coli* foi digerido com *NheI* e *AscI* e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 420 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento resultante foi depois ligado dentro do vetor “esquerdo+pyd4#1” linearizado em uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 100 ng de vetor *NheI/AscI* “esquerdo+pyd4#1”, 31 ng do inserto panD digerido com *NheI* e *AscI*, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min. à temperatura ambiente e depois colocada em gelo. 5 µL desta reação foi usada para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado para *E. coli* pela digestão com *AscI* e *Pvu II* como aqui descrito um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt070.

[0351] O plasmídeo pMhCt070 serviu como o vetor base

para a adição de homólogos de ADC e BAAT que foram otimizados no códon para a expressão no hospedeiro de levedura. pMhCt070 foi digerido com *XbaI* e *PacI*, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 6,5 kbp foi excisada do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. Um fragmento digerido com *XbaI* e *PacI* descrito acima contendo um polinucleotídeo que codifica o BAAT *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 140) e otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* foi ligado dentro do vetor de corte pMhCt070 como segue: Uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 42 ng do vetor pMhCt070 digerido com *XbaI* e *PacI*, 4 µL do inserto BAAT de *S. avermitilis* otimizado no códon digerido com *XbaI* e *PacI*, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min. à temperatura ambiente, e depois colocada em gelo. 5 µL desta reação foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada da ORF de BAAT desejada pela digestão com *XbaI*, *PacI*, e *Eco RV* como aqui descrito um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt072.

[0352] O gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão na *E. coli* em pMhCt072 depois foi substituído com uma versão otimizada no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 130). O gene de ADC otimizado no códon de *I. orientalis* (SEQ ID NO: 130) e os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador foram amplificados com iniciadores 0611378 e 0611379. A reação de PCR (50 µL)

conteve 1 µL de uma diluição 1 para 50 de mini-prep do plasmídeo contendo o panD otimizado no códon de *S. avermitilis* (GeneArt®), Tampão de Reação 1X ThermoPol (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0611378 e 0611379, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 2 µL 100 mM de MgSO₄, e 2 unidades de Vent_R® (exo-) DNA polimerase (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 94°C por 2 minutos, seguido por 34 ciclos cada um a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE onde um produto de PCR com aproximadamente 420 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0353] 5 µL de um mini-prep de pMhCt072 foi digerido com *Xba*I e *Pac*I, tratados com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 7,5 kbp foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR isolado contendo o gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon a partir do acima foi adicionado ao vetor na reação do Kit IN-FUSION® Advantage PCR Cloning (Clontech) que segue: o volume de reação de 10 µL foi composto de 6 µL do vetor pMhCt072 digerido e purificado, 1 µL do produto de PCR panD purificado otimizado no códon, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL de enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocado em gelo. A reação foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold

(Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejada pela digestão com *NheI*, *AscI*, e *ClaI*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt074 (Figura 7).

[0354] pMhCt074 é uma construção que alveja PDC à esquerda contendo o promotor PDC que direciona a expressão da ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon (panD, SEQ ID NO: 130), o terminador TAL, o promotor ENO1 que direciona a expressão do BAAT de *S. avermitilis* otimizado no códon (SEQ ID NO: 140), o terminador RKI, o promotor *ura3* de *I. orientalis* e o fragmento 5' da ORF de URA3 de *I. orientalis*.

Fragmento à esquerda contenda ADC de S. avermitilis (SEQ ID NO: 130) e BAAT de S. kluyveri (SEQ ID NO: 142)

[0355] Para criar uma construção de DNA à esquerda que expressa o BAAT *S. kluyveri* (pyd4), um fragmento da digestão com *XbaI* e *PacI* contendo a sequência de BAAT de *S. kluyveri* otimizada no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 142, *supra*) foi ligado dentro do vetor digerido pMhCt070 acima como segue: Uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 42 ng do vetor pMhCt070 digerido com *XbaI* e *PacI*, 4 µL do inserto pyd4 de *S. kluyveri* otimizado no códon digerido com *XbaI* e *PacI*, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 minutos na temperatura ambiente, e depois colocada em gelo. 5 µL desta reação foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a

inserção apropriada da ORF de *pyd4* desejada pela digestão *Xba*I, *Pac*I, e *Eco* RV. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt073.

[0356] O plasmídeo pMhCt073 contém a sequência BAAT (*pyd4*) de *S. kluyveri* desejada otimizada no códon para a expressão em *I. orientalis* mas não contém a sequência ADC (*panD*) de *S. avermitilis* desejada otimizada no códon para a expressão em *I. orientalis*. Para se mover nesta ORF, 5 µL de uma mini-prep de pMhCt073 foram digeridos com *Xba*I e *Pac*I, tratados com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE. Uma faixa de aproximadamente 7,5 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR isolado contendo a *panD* de *S. avermitilis* otimizada no códon (*supra*) foi adicionado ao vetor na reação do Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) que segue: o volume de reação de 10 µL foi composto de 6 µL do vetor pMhCt073 digerido e purificado, 1 µL do produto de PCR *panD* purificado otimizado no códon, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL da enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto à inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *Nhe*I, *Asc*I, e *Cla*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt076.

[0357] O plasmídeo pMhCt076 é uma construção que alveja

PDC à esquerda contendo o promotor PDC que direciona a expressão da ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (panD, SEQ ID NO: 130), o terminador TAL, o promotor ENO1 que direciona a expressão do BAAT de *S. kluyveri* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (pyd4, SEQ ID NO: 142), o terminador RKI, o promotor ura3 de *I. orientalis* e o fragmento 5' da ORF URA3 de *I. orientalis*.

[0358] O sequenciamento determinou que o plasmídeo pMhCt076 contém uma mudança de nucleotídeo de A para T em cerca de 200 pares de base dentro do promotor PDC, e uma mudança de nucleotídeo de G para T ~2/3 do caminho através do promotor PDC que estão presentes no vetor precursor pMhCt068 (*supra*). Para tratar qualquer problema a cerca da alteração potencial na expressão de gene, uma construção similar a pMhCt076 mas contendo o promotor PDC corrigido foi clonada como descrito abaixo.

[0359] 5 µL de uma mini-prep de pMhCt082 foram digeridos com Nhe e PacI, tratados com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 4,7 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. 4 µL de uma mini-prep de pMhCt076 foram digeridos com NheI e PacI e purificados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 3,3 kbp foi excisada do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O vetor de 4,7 kbp e inserto de 3,3 kbp purificados foram depois ligados juntos em uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 3 µL de vetor de v, 6 µL de inserto de pMhCt076, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min na temperatura ambiente, e depois colocada em gelo. 5 µL desta reação foram

usados para transformar células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas na temperatura ambiente por três dias. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *StuI* e *Not I*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt083 (Figura 8).

[0360] O plasmídeo pMhCt083 é idêntico ao pMhCt076 exceto que o primeiro contém a sequência do promotor PDC correta, enquanto o último tem uma mudança de nucleotídeo de A para T e uma mudança de nucleotídeo de G para T descritas acima. O teste não mostrou nenhuma diferença na atividade enzimática de panD a partir das cepas que expressam panD de *S. avermitilis* a partir da integração de pMhCt076 e pMhCt077 quando comparado com pMhCt083 e pMhCt077.

Fragmento à esquerda contenda ADC de S. avermitilis (SEQ ID NO: 130) e gabT de Saccharomyces cerevisiae (SEQ ID NO: 141)

[0361] 4 µL de uma mini-prep de pMhCt083 foram digeridos com *XbaI* e *PacI*, tratados com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 6,5 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. Um fragmento digerido com *XbaI* e *PacI* contendo o *gabT* de *Saccharomyces cerevisiae* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (UGA1, SEQ ID NO: 141) foi ligado dentro do vetor de corte pMhCt083 como segue: Uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 1 µL do vetor pMhCt083 purificado digerido com *XbaI* e *PacI*, 3 µL de inserto UGA1 de *S. cerevisiae*

otimizado no códon digerido com *XbaI* e *PacI*, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min na temperatura ambiente e depois o tubo foi colocado em gelo. 5 µL desta reação foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto à inserção apropriada da ORF de BAAT desejada pela digestão com *XbaI* e *BglIII*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi designado pMhCt087 (Figura 9).

[0362] O plasmídeo pMhCt087 é uma construção que alveja PDC à esquerda contendo o promotor PDC que direciona a expressão da ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (panD, SEQ ID NO: 130), o terminador TAL, o promotor ENO1 que direciona a expressão do gabT de *S. cerevisiae* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (UGA1, SEQ ID NO: 141), o terminador RKI, o promotor ura3 de *I. orientalis* e o fragmento 5' da ORF de URA3 de *I. orientalis*.

Exemplo 3A-4: Construção de fragmentos à direita dos vetores de inserção para expressar aspartato 1-descarboxilase (ADC), β-alanina aminotransferase (BAAT), e ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local pdc

Fragmento à direita contendo 3-HPDH de E. coli (SEQ ID NO: 143)

[0363] 2 µg de uma mini-prep de pMhCt069 (*supra*) foram digeridos com *XbaI* e *PacI*, tratados com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 2,2 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções

do fabricante. Um fragmento digerido com *Xba*I e *Pac*I contendo o gene de 3-HPDH da *E. coli* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (ydfG, SEQ ID NO: 143) foi ligado dentro do vetor de corte pMhCt069 como segue: Uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 2 µL do vetor pMhCt069 purificado digerido com *Xba*I e *Pac*I, 4 µL do inserto ydfG da *E. coli* otimizado no códon digerido com *Xba*I e *Pac*I, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min na temperatura ambiente, e depois colocada em gelo. 5 µL desta reação foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados na temperatura ambiente por três dias. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada da ORF de ydfG desejada pela digestão com *Xba*I, *Pac*I, e *Eco* RV. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA como aqui descrito e designado pMhCt075 (Figura 10).

[0364] O plasmídeo pMhCt075 contém o fragmento 3' da ORF de URA3 de *I. orientalis*, o terminador URA3 de *I. orientalis* seguido pelo promotor ura3 (para enlaçamento posterior do marcador de URA3), o gene de 3-HPDH da *E. coli* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (ydfG, SEQ ID NO: 143) direcionado pelas regiões de promotor TDH3 de *I. orientalis*, e a terminadora de PDC de *I. orientalis*.

Fragmento à direita contendo 3-HPDH de Saccharomyces cerevisiae (SEQ ID NO: 144)

[0365] Um fragmento digerido com *Xba*I e *Pac*I contendo o gene YMR226C da *S. cerevisiae* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (*supra*) foi ligado dentro do vetor de corte pMhCt069 como segue: Uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 2 µL do vetor pMhCt069 purificado digerido com *Xba*I e

PacI, 4 µL do inserto de 3-HPDH de *S. cerevisiae* otimizado no códon (YMR226C, SEQ ID NO: 144) digerido com *XbaI* e *PacI*, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min na temperatura ambiente, e depois colocada em gelo. 5 µL desta reação foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados na temperatura ambiente por três dias. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto à inserção apropriada da ORF de YMR226C desejada pela digestão com *XbaI*, *PacI*, e *Eco RV*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e foi designado pMhCt077 (Figura 11).

[0366] O plasmídeo pMhCt077 contém o fragmento 3' da ORF de URA3 de *I. orientalis*, o terminador URA3 de *I. orientalis* seguido pelo promotor *ura3* (para enlaçamento posterior do marcador de URA3), o gene de 3-HPDH de *S. cerevisiae* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (YMR226C, SEQ ID NO: 144) direcionado pelas regiões de promotor TDH3 de *I. orientalis*, e do terminador PDC de *I. orientalis*.

Exemplo 3A-5: Cepas de levedura heterozigotas e homozigotas que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC), β-alanina aminotransferase (BAAT), e ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local PDC

[0367] Os Exemplos 3A-3 e 3A-4 acima descrevem a construção de várias construções à esquerda ou à direita para alvejar a expressão de três genes ectópicos simultaneamente ao local PDC de *I. orientalis*. Antes da transformação, aproximadamente 10 µg de cada construção (uma construção desejada à esquerda e uma construção desejada à direita) foram digeridos com *NotI* para liberar o DNA de transformação desejado do vetor de cadeia principal pUC18; para a maioria das digestões, a

enzima de restrição *PvuI* também foi incluída com a digestão com *NotI*. A enzima de restrição *PvuI* digere o fragmento de vetor pUC18 aproximadamente na metade, tornando a separação do fragmento de DNA maior, desejado mais fácil pela eletroforese em gel. A faixa contendo o cassete de expressão maior foi separada do DNA da cadeia principal pUC18 pela eletroforese em gel, excisado do gel, e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. 30 µL de tampão de eluição foram usados para a etapa de eluição. Uma razão equimolar de uma construção à esquerda e uma à direita totalizando 10 µL foi usada para transformar a cepa CNB1 de *I. orientalis* ou derivado apropriado. Os transformantes foram selecionados em placas de seleção ura e colocados a 37°C para o crescimento. No dia seguinte, aproximadamente doze transformantes foram escolhidos e novamente riscados para colônias únicas em placas de seleção de ura e cultivadas a 37°C. No dia seguinte, uma única colônia foi escolhida de cada um dos riscos gerados por cada transformante inicial e novamente riscados em placas de seleção ura para colônias únicas. Depois de outra noite de crescimento a 37°C, uma colônia única final foi escolhida de cada risco e novamente riscada em uma placa de seleção de ura e cultivada durante a noite a 37°C. Depois desta segunda rodada de purificação e crescimento de colônia única, o DNA genômico foi preparado para o uso na PCR para verificar a integração alvo desejada ocorrida como descrito acima. Para o alvejamento para PDC usando as construções à esquerda e à direita, a verificação do evento de integração desejado foi determinada usando os iniciadores 0611814, 0611554, e 0611555. O iniciador 0611554 liga-se no DNA genômico de *I. orientalis* exatamente 3' da região do terminador PDC presente nas construções de alvejamento de PDC à direita; o iniciador 0611555 liga-se na ORF de PDC e amplifica para interrupção; e o iniciador 0611814 liga-se próximo à extremidade 3' da região do promotor TDH3 presente nas construções à

direita e amplifica na direção 3'. A geração de uma faixa de aproximadamente 1,9 kbp a partir das PCRs que contiveram os iniciadores 0611814 e 0611554 indicou a ocorrência dos eventos de integração desejados no local PDC. A geração de uma faixa de aproximadamente 1,4 kbp a partir das PCRs que contiveram os iniciadores 0611555 e 0611554 indicou a presença de um local PDC do tipo selvagem. Visto que este evento de integração é o primeiro evento de alvejamento no CNB1 diplóide de *I. orientalis*, os integrantes desejados mostrarão tanto uma faixa de 1,9 kbp para os iniciadores 0611814 e 0611554 quanto uma faixa de 1,4 kbp dos iniciadores 0611555 e 0611554. Dois transformantes independentes dando o padrão de faixa desejado para cada plasmídeo foram designados como mostrado na Tabela 15.

Tabela 15: Genótipos Transformantes

Cepa	Plasmídeo com fragmento à esquerda	Plasmídeo com fragmento à direita	Genótipo
yMhCt002	pMhCt074	pMhCt075	pdcΔ::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.SaBAAT, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.EcYdfG)/PDC ura3-/ura3--
74/75 #1			
yMhCt004	pMhCt083	pMhCt077	pdcΔ::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.SkPyd4, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C)/PDC ura3-/ura3--
83/77 #2			
yMhCt005	pMhCt087	pMhCt077	pdcΔ::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C)/PDC ura3-/ura3--
87/77 #2			

[0368] Em seguida, um derivado ura de yMhCt004 ou yMhCt005 foi isolado como descrito acima. DNAs genômicos de várias colônias resistentes a FOA de cada cepa precursora foram triados pela PCR para o evento de *loop-out* desejado com iniciadores 0611815 e 0611817. O iniciador 0611815 recoze no terminador RKI da construção à esquerda e amplifica na direção do promotor ura3. O iniciador 0611817 recoze no promotor TDH3 e amplifica de volta na direção do cassete URA3. A presença de uma faixa de 828 pares de base indica a presença de apenas o sítio cicatriz ura3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como

desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 2,2 kbp indica a presença do cassete promotor ura3ORF de Terminador URA3 de Promotor ura3 de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. As reações da PCR com DNA polimerase Crimson Taq® (New England Biolabs) foram realizadas como descrito acima. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora yMhCt004, designada yMhCt012, e uma colônia resistente a FOA da cepa precursora yMhCt005, designada yMhCt007, deram a faixa de 828 pares de base desejada.

[0369] As cepas yMhCt012 e yMhCt007 foram em seguida transformadas para criar cepas homozigotas com o gene de PDC deletada e recolocada com cassetes de expressão para panD, pyd4, e YMR226C ou panD, UGA1, e YMR226C, respectivamente. A cepa yMhCt012 foi transformada com DNA linear a partir de pMhCt083 e pMhCt077, enquanto que yMhCt007 foi transformada com DNA linear de pMhCt087 e pMhCt077. Depois de duas rodadas de purificação de colônia única, DNAs genômicos de vários transformantes de cada cepa precursora foram triados pela PCR com iniciadores 0611815 e 0611817 como descritos acima. Dois integrantes independentemente isolados de cada cepa precursora que tiveram ambos a faixa de 828 pares de base (da amplificação da região de cicatriz ura3 do local PDC originalmente alvejado) e a faixa de 2,2 kbp (da integração do cassete promotor ura3ORF, Terminador URA3, Promotor ura3, URA3 do segundo evento de integração no outro cromossoma) foram designados como mostrado na Tabela 16.

Tabela 16: Genótipos Transformantes

Designação de Cepa	Cepa geradora	Genótipo
yMhCt013	yMhCt012	pdca:::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.SkPyd4, URA3Scar, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C) /pdca:::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} Opt.SkPyd4-URA3,TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C) ura3-/ura3-
yMhCt014		
yMhCt008	yMhCt007	pdca:::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -

yMhCt009	Opt.ScUGA1, URA3Scar,TDH3 _{promo} - Opt.ScYMR226C) /pdcΔ:: (PDC _{promo} - Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3,TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C) ura3- /ura3-
----------	--

[0370] Um derivado ura de yMhCt008 foi isolado como descrito acima. DNAs genômicos de várias colônias resistentes a FOA da cepa precursora yMHCt008 foram triados pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com os iniciadores 0611815 e 0611817 como aqui descritos. a presença de uma faixa de 828 pares de base indicou a presença apenas do sítio de cicatriz ura3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado. Isolados que mostraram apenas a faixa de 828 pares de base foram triados ainda usando os iniciadores 0611555 e 0611554 como aqui descrito. A geração de uma faixa de aproximadamente 1,4 kbp a partir das PCRs que contiveram os iniciadores 0611555 e 0611554 indicou a presença de um local PDC do tipo selvagem. Um isolado que carece desta faixa, indicando que o local PDC em ambos os cromossomas foi perdido, foi designado yMhCt010.

[0371] As cepas foram cultivadas em frascos agitados e CFE foi preparado e ensaiado quanto à atividade de aspartato descarboxilase (ADC) e atividade de 3-HP desidrogenase (3-HPDH) como aqui descrito. Os resultados experimentais para vários conjuntos de ensaio (indicados como Testes de 1 a 4) são mostrados na Tabela 17. As cepas do Teste 1 da Tabela 17 também foram analisados pela SDS-PAGE como aqui descrito. A cepa 74/75 #1 e a cepa yMhCt002 do Teste 1 deram uma faixa na análise de SDS-PAGE a 27 kD que não estava presente na cepa de controle do Teste 1 (MBin500). O tamanho desta faixa de proteína é compatível com a sua identidade como a proteína codificada pelo gene ydfG.

Tabela 17: Dados de atividade de enzima transformante

Teste	Cepa	Gene Superexpresso	Tipo de Alelo	Atividade de ADC	Atividade de 3-HPDH
1	MBin500 (controle)	N/A	N/A	Não testado	0,25
2				0,00	0,12
3				0,00	0,23
4				0,00	0,45
4				0,00	0,54
1	74/75 #1	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 143) BAAT (SEQ ID NO: 140)	heterozigoto	Não testado	0,68
1	yMhCt002	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 143) BAAT (SEQ ID NO: 140)	heterozigoto	Não testado	0,93
2	yMhCt004	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) BAAT (SEQ ID NO: 142)	heterozigoto	0,26	1,81
4				0,30	2,20
4				0,24	1,81
2	83/77 #2	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) BAAT (SEQ ID NO: 142)	heterozigoto	0,25	1,80
2	yMhCt005	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) gabT (SEQ ID NO: 141)	heterozigoto	0,17	1,51
4				0,17	1,26
4				0,14	1,24
2	87/77 #2	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) gabT (SEQ ID NO: 141)	heterozigoto	0,20	1,68
3	yMhCt005	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) gabT (SEQ ID NO: 141)	heterozigoto	0,16	1,27
3	yMhCt008	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) gabT (SEQ ID NO: 141)	homozigoto	0,80	2,29
4				0,25	0,85
4				0,42	1,37
3	yMhCt009	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) gabT (SEQ ID NO: 141)	homozigoto	,045	1,33
4				0,22	0,55
4				0,43	1,15
4	yMhCt013	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) BAAT (SEQ ID NO: 142)	homozigoto	0,47	0,65
4				0,50	0,82
4	yMhCt014	ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144) BAAT (SEQ ID NO: 142)	homozigoto	0,34	0,51
4				0,54	1,06

[0372] Os resultados experimentais para um outro conjunto de ensaio são mostrados na Tabela 17 (Teste 2). As cepas do Teste 2 da Tabela 17 também foram analisadas pela SDS-PAGE como aqui descrito. Todas as cepas do Teste 2 exceto MBin500 deram uma faixa em 29 kD na análise de SDS-PAGE. O tamanho desta faixa de proteína é compatível com a sua identidade como a proteína codificada pelo gene YMR226c. As cepas yMhCt005 e 87/77 #2 para o Teste 2 deram uma faixa em 53 kD que não estava presente nas três outras amostras para este teste. O tamanho desta faixa de

proteína é compatível com a sua identidade como a proteína codificada pelo gene UGA1.

[0373] Os resultados experimentais para um outro conjunto de ensaio são mostrados na Tabela 17 (Teste 3). As cepas do Teste 3 da Tabela 17 também foram analisadas pela SDS-PAGE como aqui descrito. Todas as cepas do Teste 3 exceto MBin500 deram uma faixa em 53 kD e uma faixa em 29 kD na análise de SDS-PAGE. Os tamanhos destas faixas de proteína são compatíveis com as proteínas codificadas pelos genes UGA1 e YMR226c, respectivamente. As cepas MBin500 e yMhCt005 do Teste 3 mostraram uma faixa em 64 kD na análise de SDS-PAGE que foi ausente em yMhCt008 e yMhCt009 para este teste. O tamanho desta faixa de proteína é compatível com a sua identidade como a proteína codificada pelo gene de piruvato descarboxilase (PDC) nativo em CNB1 de *I. orientalis*.

[0374] Os resultados experimentais para um outro conjunto de ensaio são mostrados na Tabela 17 (Teste 4). As cepas do Teste 4 da Tabela 17 também foram analisados pela SDS-PAGE como aqui descrito. Todas as cepas do Teste 4 exceto MBin500 deram uma faixa em 29 kD. O tamanho desta faixa de proteína é compatível com a sua identidade como a proteína codificada pelo gene YMR226c. As cepas yMhCt005, yMhCt008, e yMhCt009 do Teste 4 mostraram uma faixa a 53 kD. O tamanho desta faixa é compatível com a proteína codificada pelo gene UGA1. As cepas yMhCt013, e yMhCt014 do Teste 4 mostrou uma faixa tênue a 53 kD. O tamanho desta faixa é compatível com a proteína codificada pelo gene PYD4. As cepas MBin500, yMhCt004, e yMhCt005 do Teste 4 mostraram uma faixa a 64 kD que foi ausente nas cepas yMhCt008, yMhCt009, yMhCt013, e yMhCt014. O tamanho desta faixa de proteína é compatível com a sua identidade como a proteína codificada pelo gene de piruvato descarboxilase (PDC) nativo em CNB1 de *I. orientalis*.

[0375] As cepas MBin500 e yMhCt008 foram testadas

avaliadas em biorreatores para a produção de 3-HP, usando o método aqui descrito. A cepa de controle MBin500 não produziu nenhum 3-HP detectável (média de duas fermentações independentes). A cepa yMhCt008 produziu 2,45 g/L de 3-HP (média de doze fermentações independentes).

Exemplo 3A-6: Cepas de levedura que expressam β -alanina aminotransferase (BAAT) ou ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local adh1202, e que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC), β -alanina aminotransferase (BAAT), e ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local pdc

[0376] 20 μ g de pMhCt077, pMhCt083, e pMhCt087 (*supra*) foram digeridos com *NotI* e *PvuI* e depois conduzidos em um gel de agarose a 1% usando tampão de 89 mM de Tris base-89 mM de Ácido Bórico-2 mM de EDTA dissódico (TBE). Os fragmentos digeridos com *NotI* de 3815 pares de base, 5332 pares de base, ou 5320 pares de base de pMhCt077, pMhCt083, e pMhCt087, respectivamente, foram excisados do gel e extraídos da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen). 560 ng de pMhCt077 digerido com *NotI* e 560 ng de pMhCt083 ou pMhCt087 digeridos com *NotI* foram transformados nas cepas MIBa320, MIBa321, e MIBa322. MIBa320 foi transformado com as combinações de pMhCt077/83 e pMhCt077/87. MIBa321 foi transformado com pMhCt077/87 e MIBa322 foi transformado com pMhCt077/83 como aqui descrito. Os transformantes foram plaqueados em meio de seleção ura e incubados por aproximadamente 60 horas na temperatura ambiente. Os transformantes foram novamente riscados no meio de seleção ura e incubadas a 37°C durante a noite. O DNA genômico foi preparado a partir das colônias URA3+ e checado pela PCR como aqui descrito para confirmar a integração do cassete de expressão. O par de iniciador 611814 e 611554 amplifica um fragmento de 1,9 kbp indicando integração. O par de iniciador 611555 e 611554 amplifica um fragmento de 1,4 kbp indicando um local do tipo selvagem. Um

transformante URA3+ de cada linhagem que amplificou os fragmentos de PCR de 1,9 kbp com 611554 e 611814 e 1,4 kbp com 611555 e 611554 foi salvo; estes foram designados MIBa323, MIBa324, MIBa325, e MIBa327 (ver a Tabela 18 para os genótipos). Os promotores e terminadores foram derivados dos genes de *I. orientalis*.

Tabela 18: Genótipos Transformantes

Designação de cepa	Genótipo
MIBa323	adh1202Δ::(PDC _{promo} -Opt.ScYMR226c, URA3Scar)/ adh1202Δ::(PDC _{promo} -Opt.ScYMR226c, URA3Scar) pdcΔ::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226c)/PDC ura3-/ura3-
MIBa324	adh1202Δ::(PDC _{promo} -Opt.ScYMR226c, URA3Scar)/ adh1202Δ::(PDC _{promo} -Opt.ScYMR226c, URA3Scar) pdcΔ::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.SkPyd4, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226c)/PDC ura3-/ura3-
MIBa325	adh1202Δ::(PDC _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3Scar)/adh1202Δ::(PDC _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3Scar) pdcΔ::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226c)/PDC ura3-/ura3-
MIBa327	adh1202Δ::(PDC _{promo} -Opt.SkPyd4, URA3Scar)/ adh1202Δ::(PDC _{promo} -Opt.SkPyd4, URA3Scar) pdcΔ::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.SkPyd4, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226c)/PDC ura3-/ura3-

[0377] As cepas foram cultivadas em frascos agitados e CFE foram preparados e ensaiados quanto à atividade de 3-HP desidrogenase (3-HPDH) como aqui descrito. Os resultados são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Gene Superexpresso	Atividade de 3-HPDH
MBin500 (control)	N/A	0,14
MIBa314	gabT (SEQ ID NO: 141)	0,09
MIBa318	gabT (SEQ ID NO: 141)	0,41
MIBa321	gabT (SEQ ID NO: 141)	0,08
MIBa325	gabT (SEQ ID NO: 141) ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144)	1,15
MIBa315	BAAT (SEQ ID NO: 142)	0,12
MIBa319	BAAT (SEQ ID NO: 142)	0,17
MIBa322	BAAT (SEQ ID NO: 142)	0,09
MIBa327	BAAT (SEQ ID NO: 142) ADC (SEQ ID NO: 130) 3-HPDH (SEQ ID NO: 144)	0,98
MIBa316	3-HPDH (SEQ ID NO: 144)	0,48
MIBa317	3-HPDH (SEQ ID NO: 144)	2,15
MIBa320	3-HPDH (SEQ ID NO: 144)	1,07
MIBa323	3-HPDH (SEQ ID NO: 144) ADC (SEQ ID NO: 130)	2,66

	gabT (SEQ ID NO: 141)	
MIBa324	3-HPDH (SEQ ID NO: 144) ADC (SEQ ID NO: 130) BAAT (SEQ ID NO: 142)	2,12

[0378] Os derivados de ura de MIBa323, MIBa324, MIBa325 e MIBa327 foram isolados como aqui descrito. O DNA genômico foi preparado a partir de colônias resistentes a FOA e checados pela PCR como aqui descrito para confirmar a perda do marcador selecionável URA3. O iniciador 0611815 recoze no terminador RKI da construção à esquerda e amplifica na direção do promotor ura3, e o iniciador 0611817 recoze no promotor TDH3 e amplifica de volta na direção do cassete URA3. A presença de uma faixa de 828 pares de base indica a presença apenas do sítio de cicatriz URA3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto um faixa de aproximadamente 2,2 kbp indica a presença do cassete promotor ura3ORF de Terminador URA3 de Promotor ura3 de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. As cepas Ura de MIBa323, MIBa324, MIBa325, e MIBa327, que produziram os fragmentos de PCR de 828 pares de base com iniciadores 0611815 e 0611817 foram salvos e designados MIBa335, MIBa333, MIBa334, e MIBa336, respectivamente.

[0379] As cepas MIBa333 e MIBa334 foram transformadas com os fragmentos de pMhCt077 e pMhCt087, e as cepas MIBa335 e MIBa336 foram transformadas com os fragmentos de pMhCt077 e pMhCt083 como descrito na seção acima nas transformações de MIBa320-2. Os transformantes foram selecionados quanto ao crescimento em meio de seleção ura como aqui descrito. O DNA genômico foi preparado a partir das colônias URA3+ e checadas pela PCR como aqui descrito para confirmar a integração do cassete de expressão. O iniciador 0611815 recoze no terminador RKI da construção à esquerda e amplifica na direção do promotor ura3. O iniciador 0611817 recoze no promotor TDH3 e amplifica de volta na direção do cassete

URA3. A presença de uma faixa de 828 pares de base indica a presença apenas do sítio de cicatriz URA3 (um único promotor *ura3* deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado para a primeira integração, e uma faixa de aproximadamente 2,2 kbp indica a presença do cassete do promotor *ura3ORF* de Terminador URA3 de Promotor *ura3* de URA3 intacto para a segunda integração. O par de iniciador 0611815 e 0611816 amplifica um fragmento de 625 pares de base quando o marcador *ura* está presente. Os iniciadores 0611555 e 0611554 amplificam um fragmento de 1,4 kbp quando o PDC local está presente. Os integrantes homozigotos não devem amplificar um fragmento com estes iniciadores. Um transformante URA3+ de cada linhagem que amplificou fragmentos de PCR de 828 pares de base e 2,2 kbp com iniciadores 0611815 e 0611817, 625 pares de base com iniciadores 0611815 e 0611816 e no fragmento com iniciadores 0611555 e 0611554 foi salvo; estes foram designados MIBa340, MIBa341, MIBa345, e MIBa348 (ver Tabela 20A). Promotores e terminadores foram derivados dos genes de *I. orientalis*.

Tabela 20A: Transformantes genótipos

Designação de Cepa	Genótipo
MIBa345	$adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c URA3Scar})/adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c URA3Scar})$ $pd\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SaPanD ENO1}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScUGA1, URA3Scar, TDH3}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c})/pd\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SaPanD, ENO1}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScUGA1, URA3, TDH3}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c}) ura3-/ura3-$
MIBa348	$adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c URA3Scar})/adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c URA3Scar})$ $pd\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SaPanD, ENO1}_{\text{promo}}\text{-Opt.SkPyd4, URA3Scar, TDH3}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c}) / pd\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SaPanD, ENO1}_{\text{promo}}\text{-Opt.SkPyd4, URA3, TDH3}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c}) ura3-/ura3-$
MIBa340	$adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScUGA1 URA3Scar})/adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScUGA1 URA3Scar})$ $pd\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SaPanD, ENO1}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScUGA1, URA3Scar, TDH3}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c})/pd\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SaPanD, ENO1}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScUGA1, URA3, TDH3}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c}) ura3-/ura3-$
MIBa341	$adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SkPyd4 URA3Scar})/adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SkPyd4 URA3Scar})$ $pd\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SaPanD, ENO1}_{\text{promo}}\text{-Opt.SkPyd4, URA3Scar, TDH3}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c}) / pd\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.SaPanD, ENO1}_{\text{promo}}\text{-Opt.SkPyd4, URA3, TDH3}_{\text{promo}}\text{-Opt.ScYMR226c}) ura3-/ura3-$

[0380] As atividades de aspartato 1-descarboxilase (ADC),

beta-alanina aminotransferase (BAAT) e 3-HP desidrogenase (3-HPDH) em CFE preparadas a partir das cepas MBin500 (controle), MIBa345, MIBa348, MIBa340 e MIBa341 foram comparadas. Os resultados deste experimento são mostrados na Tabela 20B.

Tabela 20B: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Genes Superexpressos	Fontes de gene	Atividade de ADC	Atividade de BAAT	Atividade de 3-HPDH
MBin500 (controle)	N/A	N/A	0,002	0,61	0,4
MIBa345	YMR226c (SEQ ID NO: 144)	<i>S. cerevisiae</i>	0,194	14,37	79,5
	ADC (SEQ ID NO: 130)	<i>S. avermitilis</i>			
	UGA1 (SEQ ID NO: 141)	<i>S. cerevisiae</i>			
MIBa348	YMR226c (SEQ ID NO: 144)	<i>S. cerevisiae</i>	0,169	173,67	76,7
	ADC (SEQ ID NO: 130)	<i>S. avermitilis</i>			
	PYD4 (SEQ ID NO: 142)	<i>S. kluyveri</i>			
MIBa340	YMR226c (SEQ ID NO: 144)	<i>S. cerevisiae</i>	0,239	19,51	64,8
	ADC (SEQ ID NO: 130)	<i>S. avermitilis</i>			
	UGA1 (SEQ ID NO: 141)	<i>S. cerevisiae</i>			
MIBa341	YMR226c (SEQ ID NO: 144)	<i>S. cerevisiae</i>	0,22	386,92	65,5
	ADC (SEQ ID NO: 130)	<i>S. avermitilis</i>			
	PYD4 (SEQ ID NO: 142)	<i>S. kluyveri</i>			

Exemplo 3A-7: Fragmentos à esquerda de vetores de inserção com sequências de nucleotídeo múltiplas para a expressão de aspartato 1-descarboxilase (ADC) no local adh1202

[0381] As construções foram planejadas para incorporar quatro cópias de nucleotídeos que codificam um ADC (SEQ ID NO: 17) no local adh1202 de *I. orientalis*. Em um método similar a aquele aqui descrito para o local PDC, uma construção à esquerda e uma à direita foram planejadas para permitir a recombinação homóloga. O projeto geral dos vetores de integração e o evento de recombinação desejado são mostrados na Figura 3-. Este método também foi usado para a expressão de um ADC alternativo (SEQ ID NO: 139) como descrito nos exemplos abaixo.

[0382] Para impedir que a recombinação ocorra entre as cópias múltiplas das sequências de nucleotídeo que codificam a mesma sequência de ADC, quatro sequências de nucleotídeo distintas otimizadas no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NOs: 130, 145, 146, e 147) foram planejadas para codificar a mesma sequência de ADC da SEQ ID NO:

17. Adicionalmente, visto que o conjunto inicial de construções foi planejado para alvejar o local ald5680 de *I. orientalis*, as sequências que alvejam adh1202 foram incorporadas dentro dos vetores de dose em uma etapa posterior na clonagem. As construções ald5680 podem ser usadas para alvejar um segundo local em uma cepa CNB1 de *I. orientalis* já homozigota para quatro cópias ectópicas de panD em adh1202 com quatro cópias adicionais de panD em ald5680.

[0383] O vetor de alvejamento ald5680 à esquerda foi construído como segue. Um produto de PCR contendo a sequência exatamente 5' da ORF de ald5680, junto com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador para a clonagem foi amplificado com iniciadores 0612271 e 0612272. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição 1 para 50 de DNA plasmídico mini-prep pHJJ75 (Figura 23), tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612271 e 0612272, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 32 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE onde um produto de PCR com aproximadamente 930 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0384] De modo a permitir a purificação de uma quantidade maior de DNA, a reação de PCR descrita acima foi repetida usando o produto de PCR de 930 pares de base purificado como o DNA padrão. Cinco reações de 50 µL foram ajustadas e amplificadas com as condições descritas acima

exceto que 1 µL do produto de PCR com 930 pares de base purificado substituiu o plasmídeo pHJJ75 (*supra*) como o DNA padrão. A seguir da termociclagem, o produto de 930 pares de base amplificado foi purificado como acima.

[0385] Um fragmento contendo PDC promo-optPanD-ENO1-UGA1 (que contém a ADC de *S. avermitilis* otimizada no códon de *I. orientalis* que codifica a sequência da SEQ ID NO: 130) foi excisado de pMhCt087 (*supra*) por intermédio da digestão com *NotI* e *EcoRI*. 10 µg de um midi-prep de pMhCt087 foram digeridos com *NotI* e *EcoRI* e depois purificados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE. Uma faixa de aproximadamente 4,4 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0386] Um produto de PCR contendo a metade 5' do marcador de divisão URA3 com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador para a clonagem foi amplificado usando os iniciadores 0612273 e 0612274. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição de 1 para 50 de DNA plasmídico mini-prep de pMhCt082 (*supra*), tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612273 e 0612274, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade of iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 32 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 960 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com

as instruções do fabricante.

[0387] Para criar um vetor receptor para os fragmentos de DNA acima, o plasmídeo pUC19 (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. e Messing, J. (1985) *Gene*, 33, 103-119) foi digerido com *Hind* III e *Eco*RI, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 2,6 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0388] Os fragmentos de DNA de 930 pares de base, 4,4 kbp, e 960 pares de base purificados do acima foram depois inseridos dentro do fragmento pUC19 digerido usando um Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em um volume de reação total de 10 µL composto de 150 ng do vetor pUC19 digerido com *Hind* III e *Eco*RI, 56 ng do DNA de 930 pares de base contendo o DNA flanqueador ald5680, 250 ng do fragmento promo-optPanD-ENO1-UGA1 PDC de pMhCt087 digerido com *Not*I e *Eco*RI, 55 ng do produto de PCR 5' de 960 pares de base contendo a metade 5' do marcador de divisão de URA3, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL da enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação depois foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas na temperatura ambiente por três dias. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *Sal*I e *Hpa*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt089.

[0389] Em seguida, a ORF UGA1 em pMhCt089 foi substituída com o gene panD de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* que codifica a ADC da SEQ ID NO: 17. panD de *S. avermitilis* versão r1 (SEQ ID NO: 145) foi sintetizado pela GeneArt® no vetor pMA-T. O plasmídeo pMA-T foram digerido com *Xba*I e *Pac*I e os fragmentos resultantes foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 434 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo pMhCt089 foi digerido com *Xba*I e *Pac*I, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e os fragmentos resultantes foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 4,5 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O vetor pMhCt089 e panD de *S. avermitilis* versão r1 foram unidos em uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 2 µL de vetor *Xba*I/*Pac*I pMhCt089, 2 µL do inserto da versão r1 de panD de *S. avermitilis* *Xba*I/*Pac*I, e 1 µL Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min na temperatura ambiente, e depois colocada em gelo. 5 µL desta reação foram usados para transformar células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas na temperatura ambiente por três dias. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão em *Xba*I e *Pac*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt092.

[0390] A etapa de clonagem final para a construção à esquerda foi substituir a região homologia 5' de ald5680 presente em pMhCt092 com a região de homologia 5' adh1202. Um produto de PCR contendo a sequência 5' da ORF adh1202, junto com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador para a clonagem foi amplificado com os iniciadores 0612470 e 0612471. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição de 1 para 50 de DNA plasmídico mini-prep de pGMEr140 (um derivado de pMIBa107 aqui descrito em que a região amplificada pela PCR é idêntica), tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612470 e 0612471, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE onde um produto de PCR com aproximadamente 790 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0391] Para criar um vetor receptor para o produto de PCR acima, o plasmídeo pMhCt092 foi digerido com *HpaI* e *NotI*, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 7,0 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR e o vetor linear foram unidos usando um Kit de Clonagem de PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em um volume de reação total de 10 µL composto de 120 ng de

vetor pMhCt092 digerido com *HpaI* e *NotI*, 30 ng do produto de PCR contendo a homologia 5' de adh1202, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL de enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *BamHI* e *PstI*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt095 (Figura 12).

[0392] O plasmídeo pMhCt095 é uma construção à esquerda que alveja adh1202 de *I. orientalis* contendo o promotor PDC que direciona a expressão de um gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 130), o terminador TAL, o promotor ENO1 que direciona a expressão de um segundo gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 145), o terminador RKI de *I. orientalis*, o promotor ura3 de *I. orientalis* e o fragmento 5' da ORF de URA3 de *I. orientalis*.

Exemplo 3A-8: Fragmentos à direita de vetores de inserção com sequências de nucleotídeo múltiplas para expressar aspartato 1-descarboxilase (ADC) no local adh1202

[0393] Um produto de PCR contendo o fragmento 3' da ORF de URA3 de *I. orientalis*, junto com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador para a clonagem foi amplificado com iniciadores 0612275 e 0612276. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição 1 para 50 de DNA plasmídico mini-prep pMhCt069 (*supra*), tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos

iniciadores 0612275 e 0612276, 200 μ M de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de iProof[®] High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 32 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 1155 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN[®] Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0394] Um fragmento contendo o promotor TDH3, os sítios de restrição *Xba*I e *Pac*I para a inserção de um gene ectópico, e o terminador PDC foi excisado de pMhCt069 por intermédio da digestão com *Not*I e *Pme*I. 10 μ g de um midi-prep de pMhCt069 foram digeridos com *Not*I e *Pme*I e depois purificados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 1,85 kbp foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN[®] Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0395] Um produto de PCR contendo a sequência 3' da ORF de ald5680, junto com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador para clonagem foi amplificado com os iniciadores 0612277 e 0612278. A reação de PCR (50 μ L) conteve 1 μ L de uma diluição de 1 para 50 do DNA plasmídico mini-prep pHJJ75 (Figura 23), tampão de 1X iProof[®] HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612277 e 0612278, 200 μ M de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de iProof[®] High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 32 ciclos cada

um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 844 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0396] Os fragmentos de DNA purificados de 1155 pares de base, 1,85 kbp, e 844 pares de base do acima foram depois inseridos em pUC19 digerido com *EcoRI* e *HindIII* usando um Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em um volume de reação total de 10 µL composto de 150 ng do fragmento do vetor pUC19 digerido com *HindIII* e *EcoRI*; 66 ng do DNA de 1155 pares de base contendo a porção 3' do marcador de divisão de URA3; 106 ng do fragmento de 1,85 kbp digerido com *PmeI* e *NotI* e contendo o promotor TDH3, sítios de restrição *XbaI* e *PacI* para a inserção de um gene ectópico, e terminador PDC de pMhCt069; 48 ng do produto de PCR de 844 pares de base contendo o DNA flanqueador 3' ald5680; tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL da enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação foi diluída com 40 µL de tampão de TE e 2,5 µL foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas na temperatura ambiente por três dias. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *SalI* e *HpaI*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado ald5680 direito #20.

[0397] O terminador TKL, o promotor PGK1, sítios de

restrição *Xba*I e *Pac*I, e uma versão mais curta do terminador da região de PDC foram adicionados entre o promotor TDH3 e o DNA flanqueador 3' ald5680 de ald5680 direito #20 como segue. O terminador TKL junto com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador para a clonagem foi amplificado com os iniciadores 0612356 e 0612357. O produto de PCR desejado foi amplificado usando um gradiente de temperatura para a temperatura de recozimento e DMSO em algumas reações. Quatro reações de PCR idênticas foram preparadas, com cada reação de PCR (50 µL) contendo 1 µL de uma diluição 1 para 50 de DNA plasmídico mini-prep pACN23 (Figura 20), tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612356 e 0612357, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). Um segundo conjunto de quatro tubos foi ajustado como acima exceto que as reações cada uma incluiu a adição de 1,5 µL de DMSO. As PCRs foram realizadas em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 32 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, X°C por 20 segundos, onde X = 47,6°C, 51,8°C, 57,1°C, ou 62,1°C, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma PCR com e sem DMSO foi conduzida para cada temperatura de recozimento mostrada. A seguir da termociclagem, 10 µL de cada reação de PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE. A visualização deste gel revelou que as reações de PCR realizadas com DMSO nas duas temperaturas de recozimento mais altas e sem DMSO nas duas temperaturas de recozimento mais baixas deram o rendimento mais alto do produto de 844 pares de base desejado. Estas quatro PCRs foram combinadas, separadas pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE, onde o produto de PCR de aproximadamente 844 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com

as instruções do fabricante.

[0398] A amplificação pela PCR da região promotora de PGK1 desejada foi feita como um processo de duas etapas. Primeiro, um produto de PCR contendo o DNA promotor PGK1 foi clonado a seguir da amplificação com os seguintes iniciadores 0612150 e 0612151. A reação de PCR (50 µL) conteve 3 µL de DNA mini-prep pJLJ49 (Figura 25), 1X tampão de amplificação *Pfx* (Invitrogen), 2 mM de MgSO₄, 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612150 e 0612151, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1,25 Unidades Platinum[®] *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen). A PCR foi realizada em um EPPENDORF[®] MASTERCICLOR[®] (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 95°C por 2 minutos seguido por 25 ciclos cada um a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 3 minutos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 630 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN[®] Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0399] O produto de PCR de aproximadamente 630 pares de base foi clonado no vetor pCR4[®]BLUNT TOPO[®] (Invitrogen) usando o kit de clonagem Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR para o sequenciamento (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Em um volume de reação total de 6 µL, 0,5 ou 4 µL do produto de PCR com 630 pares de base, 1 µL de solução salina (Invitrogen) e 1 µL de pCR4[®]BLUNT TOPO[®] (Invitrogen) foram incubados juntos na temperatura ambiente por 15 minutos. 2 µL de cada reação de clonagem foram transformado em One Shot[®] TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas LB+kan e incubados a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do

produto de PCR desejado pela digestão com *EcoRI*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado PGK1_in_TOPO.

[0400] O promotor PGK1 de PGK1_in_TOPO foi isolado e purificado antes do uso como um padrão de PCR como segue. 25 µL de uma midi-prep de PGK1_in_TOPO foram digeridos com *XbaI* e *PacI* e purificados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 640 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0401] O promotor PGK1 junto com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador para a clonagem foi amplificado com os iniciadores 0612358 e 0612359 usando um gradiente de temperatura. Oito reações de PCR idênticas foram ajustadas, cada reação de PCR (50 µL) conteve 20 ng de DNA promotor PGK1 purificado por intermédio da digestão com *XbaI* e *PacI* de PGK1_in_TOPO, tampão de reação 1X Herculase (Agilent Technologies), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612358 e 0612359, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 2,5 unidades de Herculase HotStart DNA Polimerase (Agilent Technologies). As PCRs foram realizadas em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 32 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, X°C por 20 segundos, onde X = 53,7°C, 55,4°C, 57,6°C, 60,0°C, 62,4°C, 64,8°C, 66,9°C, 68,6°C, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, 10 µL de cada reação de PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE. A visualização deste gel revelou que quatro reações de PCR realizadas com a temperatura de recozimento mais alta deu o rendimento mais alto do produto de aproximadamente 700 pares de base desejado. Estas quatro PCRs foram

combinadas, separadas pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE, onde o produto de PCR de aproximadamente 700 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0402] Plasmídeo ald5680_direito #20 contém aproximadamente 870 pares de base da região a jusante da ORF de PDC de *I. orientalis* como a região terminadora de PDC. Entretanto, esta região é provavelmente maior do que a necessária para a função apropriada como um terminador e se mantido no seu tamanho corrente serviria como um catalisador para a recombinação homóloga não desejada para o local PDC. Portanto, um produto de PCR para substituir o terminador PDC em ald5680_direito #20 com uma versão menor foi amplificado com os iniciadores 0612360 e 0612361. O produto de PCR desejado foi amplificado usando um gradiente de temperatura para a temperatura de recozimento e DMSO em algumas reações. Quatro reações de PCR idênticas foram ajustadas, cada reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição 1 para 50 de DNA plasmídico mini-prep pJLJ49 (Figura 25), tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612360 e 0612361, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). Um segundo conjunto de quatro tubos foi ajustado como acima exceto que as reações cada uma incluíram a adição de 1,5 µL de DMSO. As PCRs foram realizadas em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 32 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, X°C por 20 segundos, onde X = 47,6°C, 51,8°C, 57,1°C, ou 62,1°C, e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma PCR com e sem DMSO foi conduzida para cada temperatura de recozimento mostrada. A seguir da termociclagem, 10 µL de cada reação de PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão

TAE. A visualização deste gel revelou que as quatro reações de PCR realizadas com DMSO, independente da temperatura de recozimento, deram o rendimento mais alto do produto de 338 pares de base desejado. Estas quatro PCRs foram combinadas, separadas pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE, onde o produto de PCR com aproximadamente 338 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0403] A PCR foi usada para criar um único produto de amplificação fundindo o produto de PCR contendo PGK1 com aproximadamente 700 pares de base com o produto terminador PDC com 338 pares de base. A reação de PCR (50 µL) conteve 107 ng do produto de PCR contendo PGK1, 56 ng do produto de PCR contendo o terminador PDC, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612358 e 0612361, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de Phusion® High-Fidelity DNA polimerase (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 56°C por 20 segundos, e 72°C por 2 minutos e 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 1020 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0404] O plasmídeo ald5680_direito #20 foram digeridos com *Xba*I e *Not*I, tratados com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE. Uma faixa de aproximadamente 5,6 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN®

Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0405] Os produtos de PCR de 487 pares de base e 1020 pares de base purificados do acima foram depois inseridos dentro do fragmento ald5680_direito#20 digerido usando um Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em um volume de reação total de 10 µL composto de 150 ng do vetor ald5680_direito #20 digerido com *Xba*I e *Not*I, 13 ng do produto de PCR do terminador TKL, 28 ng do produto de PCR promotor PGK1-terminador PDC, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL da enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foi usado para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *Acc*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt091.

[0406] O plasmídeo pMhCt091 é uma construção vazia à direita que alveja ald5680 de *I. orientalis* contendo o fragmento 3' da ORF de URA3 de *I. orientalis*, o promotor TDH3 de *I. orientalis* seguido pelos sítios de restrição *Nhe*I e *Asc*I para a adição de um gene de interesse, o terminador TKL de *I. orientalis*, o promotor PGK1 de *I. orientalis* seguido pelos sítios de restrição *Xba*I e *Pac*I para a adição de um segundo gene de interesse, o terminador PDC de *I. orientalis*, e o DNA flanqueador para alvejar a recombinação homóloga ao local 3' ald5680.

[0407] panD de *S. avermitilis* versão r5 (SEQ ID NO: 146) foi sintetizado no vetor 1075328_SaPanD_r5 pela GeneArt®. Os sítios de restrição *Xba*I e *Pac*I foram mudados para os sítios *Nhe*I e *Asc*I desejados

para a clonagem dentro do sítio de clonagem 5' de pMhCt091 pela PCR. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição 1 para 50 de DNA plasmídico mini-prep 1075328_SaPanD_r5 (GeneArt®), tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612378 e 0612379, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO e 1 unidade de iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 471 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0408] O plasmídeo pMhCt091 (*supra*) foi digerido com *NheI* e *AscI*, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE. Uma faixa de aproximadamente 6,9 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR contendo panD r5 purificado do acima foi depois inserido dentro do fragmento pMhCt091 digerido usando um Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em um volume de reação total de 10 µL composto de 150 ng do vetor pMhCt091 digerido de *NheI* e *AscI*, 19 ng do produto de PCR de panD r5, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL de enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foram usados para transformar

Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *Sma*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt093.

[0409] O plasmídeo pMhCt093 foram digeridos com *Xba*I e *Pac*I, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 7,4 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. *panD* de *S. avermitilis* versão r2 (SEQ ID NO: 147) foi otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* e sintetizado no vetor pMA-T pela GeneArt®. O plasmídeo foi digerido com *Xba*I e *Pac*I e os fragmentos resultantes foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE. Uma faixa de aproximadamente 434 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0410] O fragmento de ~434 pares de base purificado acima foi clonado dentro do vetor pMhCt093 digerido com *Xba*I e *Pac*I em uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 2 µL do vetor pMhCt093 digerido com *Xba*I e *Pac*I, 2 µL do fragmento com ~434 pares de base acima, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min na temperatura ambiente, e depois o tubo foi colocado em gelo. 5 µL desta reação foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os

transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas na temperatura ambiente por três dias. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *Xba*I e *Pac*I. pMhCt094 isolado foi escolhido para trabalho futuro.

[0411] A etapa de clonagem final para a construção à direita foi para substituir a região de homologia 3' ald5680 presente em pMhCt094 com a região de homologia 3' adh1202. Um produto de PCR contendo a sequência exatamente em 3' da ORF de adh1202, junto com os sítios de restrição adicionais desejados e o DNA flanqueador para a clonagem foi amplificado com os iniciadores 612472 e 612473. A reação de PCR (50 µL) conteve 1 µL de uma diluição de 1 para 50 de mini-prep DNA plasmídico pGMEr140 (*supra*), tampão de 1X iProof® HF (Bio-Rad Laboratories), 100 pmol de cada um dos iniciadores 0612472 e 0612473, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 1 unidade de iProof® High Fidelity DNA polimerase (Bio-Rad Laboratories). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 30 segundos seguido por 34 ciclos cada um a 98°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE onde um produto de PCR de aproximadamente 620 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0412] Para criar um vetor receptor para o produto de PCR acima, o plasmídeo pMhCt094 foi digerido com *Sac*II e *Not*I, tratado com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs) a 37°C por 30 minutos, e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 7,0 kbp foi excisada do gel e

purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR e vetor linear foram unidos usando um Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em um volume de reação total de 10 µL composto de 191 ng do vetor pMhCt094 digerido com *SacII* e *NotI*, 36 ng do produto de PCR contendo homologia 3' de adh1202, tampão de reação 1X In-Fusion (Clontech) e 1 µL de enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. A reação foi diluída com 40 µL de tampão TE e 2,5 µL foram usados para transformar Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada dos produtos de PCR desejados pela digestão com *NsiI* e *PvuI*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMhCt096 (Figura 13).

[0413] O plasmídeo pMhCt096 é uma construção à direita que alveja adh1202 de *I. orientalis* contendo o fragmento 3' da ORF de URA3 de *I. orientalis*, o promotor TDH3 de *I. orientalis* que direciona a expressão de um terceiro gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 146), o terminador TKL de *I. orientalis*, o promotor PGK1 de *I. orientalis* que direciona a expressão de um quarto gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 147), o terminador PDC de *I. orientalis*, e o DNA flanqueador para alvejar a recombinação homóloga ao local 3' adh1202.

Exemplo 3A-9: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC), β-alanina aminotransferase (BAAT), e ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local pdc; e aspartato 1-descarboxilase (ADC) de quatro sequências de nucleotídeo no local adh1202

[0414] Os Exemplos 3A-7 e 3A-8 acima descrevem a criação de construções à esquerda e à direita para alvejar a expressão de quatro variantes de nucleotídeo do gene de ADC de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* no local adh1202. Antes da transformação em CNB1 de *I. orientalis*, 10 µg de pMhCt095 foram digeridos com *HpaI* e *SacII* para liberar o DNA transformador desejado do vetor da cadeia principal de pUC19. Do mesmo modo, 10 µg de pMhCt096 foram digeridos com *EcoRI* e *SacII* para liberar o DNA transformador desejado do vetor de cadeia principal pUC19. O cassete de expressão da faixa contendo ~5 kbp foi separado do DNA de cadeia principal de pUC19 pela eletroforese em gel, excisado do gel, e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. 30 µL de tampão de eluição foi usado para a etapa de eluição. Uma razão equimolar de DNA de transformação linear de pMhCt095 e pMhCt096 totalizando 10 µL foram usados para transformar a cepa yMhCt010 (*supra*). Os transformantes foram selecionados em placas de seleção ura e colocados a 37°C para o crescimento. Aproximadamente doze transformantes foram escolhidos no dia seguinte e novamente riscados para colônias únicas em placas de seleção de ura e cultivadas a 37°C durante a noite, e depois uma única colônia foi escolhida de cada um dos riscos gerados por cada transformante inicial e novamente riscada em placas de seleção de ura. Depois de mais uma noite de cultivo a 37°C, uma colônia única final foi escolhida de cada risco e novamente riscado em uma placa de seleção de ura e cultivada durante a noite a 37°C. Depois desta segunda rodada de purificação de colônia única e crescimento excessivo, o DNA genômico foi preparado para o uso em PCR para verificar se a integração alvejada desejada ocorreu como aqui descrito. O alvejamento correto dos fragmentos pMhCt095 e pMhCt096 ao local adh1202 foi verificado usando os iniciadores 0611718 e 0611632 (*supra*). O iniciador 0611718 se liga na região do terminador PDC presente em pMhCt096,

enquanto que o iniciador 0611632 se liga no DNA do local adh1202 3' da região alvejada e amplifica na direção de antessentido. A geração de uma faixa de aproximadamente 727 pares de base a partir das PCRs com estes iniciadores indicou a ocorrência do evento de integração desejado no local adh1202.

[0415] Uma reação de PCR (25 µL) conteve 0,5 µL de DNA genômico para a cepa a ser triada, Tampão de Reação 1X Crimson Taq® (New England Biolabs), 25 pmol do iniciador de sentido, 25 pmol do iniciador de antessentido, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, e 0,625 unidade de DNA polimerase Crimson Taq® (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 95°C por 30 segundos, seguido por 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, e 68°C por 2,5 minutos, com uma extensão final a 68°C por 10 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE e os tamanhos das faixas visualizadas e interpretadas como descrito acima. Dois transformantes independentemente isolados dando a faixa de 727 pares de base desejada foram designados yMhCt019 ou 95/96 2 (ver genótipo na Tabela 21).

Tabela 21: Genótipo Transformante

Cepa	Cepa Geradora	Genótipo
yMhCt019	yMhCt010	adh1202Δ:: (PDC _{promo} -Opt.SaPanD r10, ENO1 _{promo} -Opt.SaPanD r1, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.SaPanD r5, PGK1 _{promo} -Opt.SaPanD r2)/ADH1202 pdcΔ:: (PDC _{promo} -Opt.SaPanD ENO1 _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3Scar, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C)/pdcΔ:: (PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3Scar, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C) ura3-
95/96 2		/ura3-

[0416] Um derivado de ura de yMhCt019 depois foi isolado como aqui descrito. Os DNAs genômicos de várias colônias resistentes a FOA de yMhCt019 foram triados pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com os iniciadores 0611815 e 0612795. O iniciador 0611815 recoze no terminador RKI da construção à esquerda e amplifica na direção do promotor

ura3, enquanto que o iniciador 0612795 recoze dentro da homologia 3' adh1202 (de pMhCt096 ou local adh1202 endógeno) de volta na direção da região 5'. As reações de PCR foram realizadas como descrito para a isolamento de yMhCt019 acima exceto que a duração da fase de extensão foi mudada para 3,5 minutos. A geração de uma faixa de 3,7 kbp com estes iniciadores indica que o evento de enlaçamento desejado ocorreu e apenas o promotor da cicatriz de URA3 permanece no local adh1202 modificado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 5,1 kbp indicaria a presença do promotor ura3ORF intacto de Terminador URA3 de Promotor ura3 do cassete de URA3, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. Uma cepa que deu a faixa de 3,7 kbp desejada foi mantida e designada yMhCt021.

[0417] De modo a isolar um derivado de yMhCt021 homozigoto para o cassete de expressão panD múltiplo em adh1202, yMhCt021 foi transformado com pMhCt095 e pMhCt096 linearizados como descrito acima. Depois de duas rodadas de purificação de colônia única e crescimento excessivo, o DNA genômico foi preparado para o uso na PCR para verificar se a integração alvejada desejada ocorreu. O alvejamento correto dos fragmentos pMhCt095 e pMhCt096 ao local adh1202 remanescente do tipo selvagem de yMhCt021 foi verificado com os iniciadores 0612891 e 0612893. O iniciador 0612891 recoze na região 3' de SaPanD r1 mais metade do sítio *PacI* depois da parada de r1 de pMhCt095. O iniciador 0612893 recoze na região 5' extrema de SaPanD r5, inclui o sítio *NheI* e o líder de pMhCt096, e amplifica na direção complementar reversa.

[0418] A geração de uma faixa de 3,2 kbp com estes iniciadores indica a presença de um promotor ura3ORF intacto do terminador URA3 do promotor ura3 do cassete de URA3 como esperado a partir do segundo evento de integração por intermédio de pMhCt095 e pMhCt096 no local adh1202 do tipo selvagem remanescente de yMhCt021, enquanto que uma faixa de aproximadamente 1,7 kbp indicaria a presença do sítio de

cicatriz de URA3 no outro local adh1202 (a partir do evento de integração inicial e enlaçamento do marcador URA3 subsequente). As reações de PCR foram realizadas como descrito para a isolamento de yMhCt019 acima exceto que a duração da fase de extensão foi mudada para 3,5 minutos. Uma cepa que deu ambos destes tamanhos de faixa foi designada yMhCt022 (ver genótipo na Tabela 22).

Tabela 22: Genótipo Transformante

Cepa	Cepa Geradora	Genótipo
yMhCt022	yMhCt021	adh1202Δ:::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD r10, ENO1 _{promo} -Opt.SaPanD r1, URA3, TDH3 _{promo} -Opt.SaPanD r5, PGK1 _{promo} -Opt.SaPanD r2)/adh1202Δ:::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD r10, ENO1 _{promo} -Opt.SaPanD r1, URA3Scar, TDH3 _{promo} -Opt.SaPanD r5, PGK1 _{promo} -Opt.SaPanD r2) pdcΔ:::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3Scar, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C)/pdcΔ:::(PDC _{promo} -Opt.SaPanD, ENO1 _{promo} -Opt.ScUGA1, URA3Scar, TDH3 _{promo} -Opt.ScYMR226C) ura3-/ura3-

[0419] As cepas foram cultivadas em frascos agitados e CFE foram preparados e ensaiados quanto à atividade de aspartato descarboxilase (ADC) como aqui. Os resultados experimentais são mostrados na Tabela 23A.

Tabela 23A: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Gene Superexpresso	Atividade de ADC
MBin500 (controle)	N/A	0,00
yMhCt019	ADC (SEQ ID NOs: 130, 145, 146, and 147), gabT (SEQ ID NO: 141), 3-HPDH (SEQ ID NO: 144)	2,18
95/96 2		2,52

[0420] As atividades de aspartato 1-descarboxilase (ADC), beta-alanina aminotransferase (BAAT) e 3HP desidrogenase (3-HPDH) em CFE preparado a partir das cepas MBin500 (controle), yMhCt019, 95/96-2, yMhCt008 e yMhCt022 foram comparadas. Os resultados deste experimento são mostrados na Tabela 23B.

Tabela 23B: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Gene Superexpresso	Fontes de Gene	Atividade de ADC	Atividade de BAAT	Atividade de 3-HPDH
MBin500 (controle)	N/A	N/A	0,002	0,61	0,4
yMhCt019	YMR226c (SEQ ID NO: 144)	<i>S. cerevisiae</i>	0,789	14,53	72,0

	ADC (SEQ ID NOs: 130, 145, 146 and 147)	<i>S. avermitilis</i>			
	UGA1 (SEQ ID NO: 141)	<i>S. cerevisiae</i>			
95/96-2	YMR226c (SEQ ID NO: 144)	<i>S. cerevisiae</i>	0,891	20,42	73,2
	ADC (SEQ ID NOs: 130, 145, 146 and 147)	<i>S. avermitilis</i>			
	UGA1 (SEQ ID NO: 141)	<i>S. cerevisiae</i>			
	YMR226c (SEQ ID NO: 144)	<i>S. cerevisiae</i>			
yMhCt008	ADC (SEQ ID NO: 130)	<i>S. avermitilis</i>	0,272	13,14	61,1
	UGA1 (SEQ ID NO: 141)	<i>S. cerevisiae</i>			
yMhCt022	YMR226c (SEQ ID NO: 144)	<i>S. cerevisiae</i>	1,233	15,44	66,7
	ADC (SEQ ID NOs: 130, 145, 146 and 147)	<i>S. avermitilis</i>			
	UGA1 (SEQ ID NO: 141)	<i>S. cerevisiae</i>			

[0421] As cepas yMhCt019 e 95/96 2 também foram analisadas pela SDS-PAGE como aqui descrito. Ambas as cepas mostraram uma faixa de proteína a 53 kD, 29 kD, ~14 kD, e a ~3 kD. Os tamanhos das faixas de proteína de 53 kD e 29 kD são compatíveis com os tamanhos das proteínas codificadas pelos genes UGA1 e YMR226c, respectivamente. Os tamanhos combinados das faixas de proteína de 14 e 3 kD são compatíveis com a proteína pós translacional clivada codificada pelo gene panD. As proteínas de 53 kD, 29 kD, 14 kD e 3 kD não foram observadas na análise de SDS-PAGE da cepa de controle MBin500.

[0422] As Cepas MBin500 e yMhCt019 foram avaliadas em biorreatores para a produção de 3-HP, usando o método aqui descrito. A cepa de controle MBin500 não produziu nenhum 3-HP detectável (média de duas fermentações independentes). A cepa yMhCt019 produziu 5,23 g/L de 3-HP (média de três fermentações independentes).

Exemplo 3A-10: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC) de quatro sequências de nucleotídeo no local adh1202

[0423] As construções adicionais foram planejadas para incorporar quatro cópias de nucleotídeos que codificam uma ADC alternativa de *B. licheniformis* (SEQ ID NO: 139) no local adh1202. Em um método similar a aquele descrito acima, uma construção à esquerda e uma à direita foram planejadas para permitir a recombinação homóloga no local adh1202 de *I.*

orientalis.

Construção de um fragmento à esquerda

[0424] O plasmídeo pMhCt095 (*supra*) foi digerido com *Xba*I e *Pac*I e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 7,3 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0425] Um gene panD da aspartato descarboxilase (ADC) de *Bacillus licheniformis* foi otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (versão 1; SEQ ID NO: 149) e sinteticamente construído no plasmídeo 1110206 (GeneArt®). O plasmídeo 1110206 foram digeridos com *Xba*I e *Pac*I e purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 380 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0426] O fragmento de ~380 pares de base purificado foi ligado dentro do vetor pMhCt095 de 7,3 kbp linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 60,5 ng do pMhCt095 digerido, 6,3 ng do fragmento de 380 pares de base de 1110206, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 1,5 h na temperatura ambiente e uma alíquota de 3 µL da reação foi transformada em células de *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto à inserção apropriada pela digestão de restrição usando *Xba*I e *Pac*I. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi designado pMeJi309.

[0427] O plasmídeo pMeJi309 foi digerido com *Nhe*I e *Asc*I

e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. Uma faixa de aproximadamente 7,3 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0428] O gene *panD* da aspartato descarboxilase de *Bacillus licheniformis* foi mais uma vez otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (versão 2; SEQ ID NO: 148) e sinteticamente construído no plasmídeo 1110205 (GeneArt®). Uma PCR foi realizada em uma mistura contendo 3 µL de 1110205, 25 pM de cada um dos iniciadores 0612695 e 0612724, 1X *pfx* tampão de amplificação (Invitrogen), 2 mM de MgSO₄, 1,25 Unidades de Platinum® *pfx* DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 50 µL. As reações de amplificação foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para 1 ciclo a 95°C por 2 minutos; 25 ciclos cada um a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo a 72°C por 3 minutos.

[0429] O produto de PCR das reações de amplificação foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. A faixa de aproximadamente 400 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR purificado foi inserido dentro do vetor pMeJi309 digerido acima usando um Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em uma reação contendo 93 ng de fragmento de vetor pMeJi309, 52 ng do produto de PCR acima, 2 µL de tampão de Reação 1X IN-FUSION® (Clontech), e 1 µL de enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. Uma amostra de 2,5 µL da reação foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C

durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando *Xba*I e *Pac*I. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMeJi310-2 (Figura 14).

Construção de um fragmento à direita

[0430] O plasmídeo pMhCt096 (*supra*) foi digerido com *Xba*I e *Pac*I e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. Uma faixa de aproximadamente 4,8 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0431] O gene panD da aspartato descarboxilase de *Bacillus licheniformis* foi mais uma vez otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (versão 3; SEQ ID NO: 151) e sinteticamente construído no plasmídeo 1110208 (GeneArt®). O plasmídeo 1110208 foi digerido com *Xba*I e *Pac*I e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e uma faixa de aproximadamente 380 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0432] O fragmento de 380 pares de base acima foi ligado dentro do vetor pMhCt096 de 7,3 kbp linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 72,2 ng de pMhCt096 digerido, 6,9 ng de fragmento de 380 pares de base de 1110208, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP, e 1 µL de T4 ligase. A reação foi incubada por 1 hora e meia na temperatura ambiente e uma alíquota de 3 µL da reação foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de

restrição usando *nheI* e *ascI*. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi designado pMeJi311.

[0433] O plasmídeo pMeJi311 foi digerido com enzimas *NheI* e *AscI* e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e uma faixa de aproximadamente 7,3 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0434] O gene *panD* da aspartato descarboxilase de *Bacillus licheniformis* foi mais uma vez otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (versão 4; SEQ ID NO: 150) e sinteticamente construído no plasmídeo 1110207 (GeneArt®). Uma PCR foi realizada em uma mistura contendo 3 µL de 1110207, 25 pM de cada um de 0612698 e 0612725, tampão de amplificação 1X *pfx* (Invitrogen), 2 mM de MgSO₄, 1,25 unidades de Platinum® *pfx* DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 50 µL. A reação de amplificação foi incubada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para 1 ciclo a 95°C por 2 minutos; 25 ciclos cada um a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo a 72°C por 3 minutos.

[0435] O produto de PCR da reação de amplificação foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. Uma faixa de aproximadamente 400 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR purificado foi inserido dentro do vetor pMeJi311 digerido acima usando um Kit de Clonagem pela PCR IN-FUSION® Advantage (Clontech) em uma reação contendo 65,1 ng do fragmento de vetor digerido por *NheI* a *AscI* pMeJi311, 85 ng do produto de PCR acima, 2 µL de tampão de reação 1X IN-FUSION® (Clontech), e 1 µL de enzima IN-FUSION® (Clontech). A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos, e depois colocada em gelo. Uma amostra de

2,5 µL da reação foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas por dois dias na temperatura ambiente. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando *NheI* e *AscI*. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi confirmado estar correto pelo sequenciamento de DNA e designado pMeJi312-2 (Figura 15).

Integração de fragmentos à esquerda e à direita

[0436] O plasmídeo pMeJi310-2 foi digerido com *HpaI* e *Sac II* e o plasmídeo pMeJi312-2 foi digerido com *EcoRI* e *SacII* como aqui descrito. Estes foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e as duas faixas de aproximadamente 5 kbp foram excisado do gel e purificados usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0437] CNB1 de *I. orientalis* foi transformado com o DNA de pMeJi310-2 e pMeJi312-2 digerido e o alvejamento e transformação em local correto foi verificado pela PCR de Crimson Taq (New England Biolabs) como aqui descrita. Os iniciadores 0612794 e 0611245 produziram uma faixa de aproximadamente 3,17 kbp; os iniciadores 612479 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 1,48 kbp; e os iniciadores 611248 e 612795 produziram uma faixa de aproximadamente 2,3 kbp. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão foi designada MeJi409-2. Um derivado de ura da cepa MeJi409-2 foi depois obtido como descrito acima.

[0438] As Cepas MBin500 e MeJi409-2 foram avaliadas em biorreatores de fermentação para a produção de 3-HP, usando os métodos aqui descritos. A cepa de controle MBin500 não produziu nenhum 3-HP detectável (média de duas fermentações independentes). A cepa MeJi409-2

(uma fermentação) produziu 4,62 g/L. De modo a considerar as diferenças na quantidade de massa de célula nestas fermentações comparadas com outras fermentações (por exemplo, futuras), a concentração de 3-HP por unidade de massa de célula (expressa como [g/L de 3-HP]/[g/L de peso de célula seca]) foi calculada ser de 0,20 para MeJi409-2.

Exemplo 3A-11: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC) e aspartato aminotransferase (AAT) no local adh9091

[0439] A sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 13) que codifica a aspartato aminotransferase (AAT) de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 14 foi amplificada pela PCR a partir do DNA genômico de *I. orientalis* usando os iniciadores 0611268 e 0611269. A reação de PCR (50 µL) conteve 50 ng da cepa de DNA genômico de *I. orientalis*, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611268 e 0611269, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 1278 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de aproximadamente 1278 pares de base, com um sítio de restrição *NruI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *PacI* na sua extremidade 3'.

[0440] O fragmento de 1278 pares de base resultante acima que compreende o gene de AAT CDS (SEQ ID NO: 13) foi depois clonado no vetor pCR2.1-TOPO e transformado nas células de *E.coli* One-Shot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do fragmento desejado pela digestão com *Bam* HI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado pelo sequenciamento e designado pGMEr111.

[0441] Os plasmídeos pGMEr121 e pGMEr111 foram duplamente digeridos com enzimas de restrição *Pac*I e *Nru*I. O fragmento de vetor resultante com 7695 pares de base, a partir do plasmídeo pGMEr121, e o fragmento de inserto resultante com 1272 pares de base que compreende a sequência codificadora AAT, a partir do plasmídeo pGMEr111, foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão 1X TBE, excisado do gel, e purificado usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0442] Uma reação de ligação foi depois ajustada com 3 µL de fragmento de vetor, 4 µL de fragmento de inserto, 2 µL de água dd estéril, 10 µL de Tampão 2X Quick Ligase e 1 µL de Quick T4 Ligase (Kit de Ligação Quick, New England Biolabs) e realizada de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação acima foi transformada em células de *E. coli* Ultracompetentes XL10-Gold® (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do inserto desejado pela digestão dupla *Sma*I/*Ppu*MI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado pelo sequenciamento e designado pGMEr126 (Figura 16).

[0443] Os plasmídeos pGMEr126 compreendem o cassete de expressão AAT de *I. orientalis*, em que a transcrição de gene é controlada pelo promotor TDH3 de *I. orientalis* e o terminador TKL, flanqueado pela região 3' truncada da sequência codificadora URA3 e o promotor *ura3*, a montante; e pela região de homologia 3' com o local *adh9091* de *I. orientalis*, a jusante.

[0444] O gene *panD* de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 130) foi amplificado pela PCR a partir do vetor pMA-T recebido da GeneArt® usando os iniciadores 061166 e 0611662. A reação de PCR (50 µL) conteve 50 ng da cepa de DNA plasmídico, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611661 e 0611662, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR com aproximadamente 453 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O comprimento total do fragmento de PCR resultante foi de aproximadamente 453 pares de base com um sítio de restrição *NruI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *ApaI* na extremidade 3'.

[0445] O fragmento resultante de 453 pares de base, que compreende a versão otimizada no códon do gene *panD* de *S. avermitilis*, foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO e transformado nas células de *E.coli* One-

Shot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do fragmento desejado pela digestão com *EcoRI*. Um plasmídeo que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado pelo sequenciamento e designado pGMEr127.

[0446] Os plasmídeos pGMEr127 e pGMEr125(a) foram digeridos com enzimas de restrição *NruI* e *Apa I*. Antes de interromper as reações de digestão 1 µL de Fosfatase Alcalina Intestinal de Bezerro (New England Biolabs) foi adicionado à digestão de pGMEr125(a) de modo a desfosforilar as extremidades e impedir a autoligação. O fragmento de vetor com 8188 pares de base resultante, do plasmídeo pGMEr125(a) (*supra*), e o fragmento de inserto com 440 pares de base, que compreendem a versão otimizada no códon do gene panD de *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 130) do plasmídeo pGMEr127 (*supra*), foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão de 1X TBE, excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0447] Uma reação de ligação foi depois ajustada com 4 µL de fragmento de vetor, 4 µL de fragmento de inserto, 9 µL de Tampão 2X Quick Ligase e 1 µL de Quick T4 Ligase (New England Biolabs) e realizada de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação acima foi transformado em células de *E. coli* Ultracompetentes XL10-Gold® (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do inserto desejado pela digestão com *BamHI*. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr130 (Figura 17).

[0448] O plasmídeo pGMEr130 compreende uma

construção feita dos seguintes fragmentos: o flanco 5' do local adh9091 de *I. orientalis*, um cassete de expressão vazio com o promotor PDC/ terminador TAL de *I. orientalis*, o cassete de expressão panD (contendo a SEQ ID NO: 130) sob o controle do promotor ENO1 e o terminador RKI de *I. orientalis*, e o fragmento 5' truncado do marcador de gene URA3 sob o controle do promotor ura3 de *I. orientalis*.

[0449] Para determinar se a cepa de levedura CNB1 de *I. orientalis* foi capaz de expressar a versão otimizada no códon de *I. orientalis* do gene panD de *S. avermitilis* (SEQ ID NO: 130) e o gene de AAT de *I. orientalis* (SEQ ID NO: 13), os plasmídeos de expressão pGMEr130 e pGMEr126 foram construídos. O plasmídeo pGMEr130 compreende (de 5' para 3') a região flanqueadora 5' para a integração genômica da construção no local adh9091 de *I. orientalis*, o cassete de expressão panD sob o controle do promotor ENO1 e do terminador RKI, e a porção 5' truncada do marcador de seleção URA3 direcionado pelo promotor ura3. O plasmídeo pGMEr126 compreende (de 5' para 3') a porção 3' do marcador de seleção URA3, o cassete de expressão de gene de AAT sob o controle do promotor TDH3 e do terminador TKL, e o flanco 3' para a integração genômica da construção no local adh9091 de *I. orientalis*. Todos os promotores e terminadores foram derivados da *I. orientalis*.

[0450] O plasmídeo pGMEr126 foi digerido com enzima de restrição *EcoRI*, que excisou um fragmento de 4758 pares de base de interesse, enquanto que o plasmídeo pGMEr130 foi digerido com enzima de restrição *Hind* III criando um fragmento de 5034 pares de base necessário para a transformação. Os fragmentos de 4758 pares de base e de 5034 pares de base foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão de 1X TBE, excisado do gel, e purificado usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0451] A CNB1 de *I. orientalis* foi cultivada e

cotransformada como aqui descrito com aproximadamente 500 ng dos fragmentos lineares tanto de 4758 pares de base quanto de 5034 pares de base. Oito cepas transformantes foram obtidas e depois cultivadas em frascos agitados. Os caldos resultantes foram usados para conduzir uma SDS-PAGE, gel de Tris-HCl (Bio-Rad Laboratories) para detectar a expressão do gene panD de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 130) e do gene *I. orientalis* da AAT (SEQ ID NO: 13). Uma cepa positiva foi designada yGMEr008 e o seu caldo também foi usado para determinar os níveis de atividade de ADC e AAT como descrito acima.

Exemplo 3A-12: Cepas de levedura que expressam piruvato carboxilase (PYC), aspartato 1-descarboxilase (ADC) e aspartato aminotransferase (AAT) no local adh9091

[0452] A sequência de nucleotídeo que codifica a piruvato carboxilase (PYC) de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 2 foi amplificada pela PCR a partir do DNA genômico de *I. orientalis* usando os iniciadores 0611266 e 0611267. A reação de PCR (50 µL) conteve 50 ng de DNA genômico de *I. orientalis*, tampão de 1X Phusion HF (New England Biolabs), 50 pmol de cada um dos iniciadores 0611266 e 0611267, 200 µM de cada um de dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 1,5 µL de DMSO a 100% (New England Biolabs) e 1 unidade de DNA polimerase Phusion High Fidelity (New England Biolabs). A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 98°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos cada um a 98°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE onde um produto de PCR de aproximadamente 3557 pares de base foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de PCR resultante teve um sítio de

restrição *XbaI* na extremidade 5' do fragmento e um sítio de restrição *PacI* na sua extremidade 3'.

[0453] O fragmento resultante de 3557 pares de base, que compreende o gene de PYC CDS de *I. orientalis* (SEQ ID NO: 1), foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO e transformado nas células de *E.coli* One-Shot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do fragmento desejado pela digestão com *EcoRI*. Seis clones que produzem os tamanhos de faixa desejados foram confirmados e designados pGMEr132,7, pGMEr132,14, pGMEr132,16, pGMEr132,25, pGMEr132,27 e pGMEr132,30. A análise de sequenciamento revelou que o plasmídeo pGMEr132.14 tem a PYC CDS apropriado mas perdeu o sítio de restrição *XbaI* na extremidade 5' da CDS. Visto que este sítio de restrição é necessário para inserir a PYC CDS no plasmídeo de expressão pGMEr125, o fragmento *HindIII* de 315 pares de base do plasmídeo pGMEr132.14 (que compreende a extremidade 5' na PYC CDS com o sítio *XbaI* alterado) foi substituído com o fragmento *HindIII* de 315 pares de base do plasmídeo pGMEr132,7, que tem uma extremidade 5' inalterada da PYC CDS incluindo o sítio *XbaI* correto. O fragmento de vetor *HindIII* de 7173 pares de base resultante, do plasmídeo pGMEr132.14, e o fragmento de inserto *HindIII* de 315 pares de base, do plasmídeo pGMEr132.7, foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão de 1X TBE, excisado do gel, e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0454] Uma reação de ligação foi depois ajustada com 4 µL de fragmento de vetor, 5 µL de fragmento de inserto, 10 µL de Tampão 2X Quick Ligase e 1 µL de Quick T4 Ligase (New England Biolabs) e realizada de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 5 µL da reação de

ligação acima foi transformada nas células da *E. coli* One-Shot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto à inserção e orientação apropriadas do inserto desejado pela digestão dupla com *Bam*HI e *Xba*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr133.

[0455] De modo a inserir a PYC CDS de *I. orientalis* a jusante do promotor PDC no plasmídeo pGMEr125(b), os plasmídeos pGMEr125(b) e pGMEr133 (*supra*) foram digeridos com *Pac*I e *Xba*I. O fragmento de vetor de 8188 pares de base resultante, do plasmídeo pGMEr125(b), e o fragmento de inserto de 3553 pares de base, que compreendem a PYC CDS de *I. orientalis* (SEQ ID NO: 1) do plasmídeo pGMEr133, foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão 1X TBE, excisados do gel, e purificados usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0456] Uma reação de ligação foi depois ajustada com 3 µL do fragmento de vetor, 6 µL do fragmento de inserto, 10 µL do Tampão 2X Quick Ligase e 1 µL do Quick T4 Ligase (New England Biolabs) e realizada de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação acima foi transformada em células da *E.coli* One-Shot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada do fragmento desejada pela digestão com *Bam*HI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi confirmado e designado pGMEr136.

[0457] O plasmídeo pGMEr136 compreende o flanco 5' do local adh9091 de *I. orientalis*, o cassete de expressão de gene de PYC de *I.*

orientalis (SEQ ID NO: 1) sob o controle do promotor PDC e terminador TAL de *I. orientalis*, um cassete de expressão vazio com um promotor ENO1 / terminador RKI de *I. orientalis*, e o fragmento 5' truncado do gene marcador URA3 de *I. orientalis* sob o controle do promotor *ura3*.

[0458] Cerca de 5 µg de plasmídeo pGMEr136 (*supra*) e 4 µg do plasmídeo pGMEr127 foram digeridos com as enzimas de restrição *Apa*I e *Nru* I. O fragmento de vetor de 11729 pares de base resultante, do plasmídeo pGMEr136, e o fragmento de inserto resultante que compreende o gene *panD* de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 130) (436 pares de base) do plasmídeo pGMEr127, foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão de 1X TBE usando um NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0459] Uma reação de ligação foi depois ajustada compreendendo 5 µL de fragmento de vetor, 4 µL de fragmento de inserto, 9 µL de Tampão 2X Quick Ligase e 1 µL de Quick T4 Ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada na temperatura ambiente por 1 hora. Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação acima foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto ao inserto desejado pela digestão com *Bam*HI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi escolhido e designado pGMEr137 (Figura 18).

[0460] O plasmídeo pGMEr137 compreende o gene de *PYC* de *I. orientalis* (SEQ ID NO: 1) sob o controle transcricional do promotor PDC e terminador TAL de *I. orientalis*, o gene *panD* de *S. avermitilis* otimizado no códon para a expressão em *I. orientalis* (SEQ ID NO: 130) sob o controle transcricional do promotor ENO1 e terminador RKI de *I.*

orientalis, o promotor *ura3* seguido pela extremidade 5' do marcador *URA3* e a região flanqueadora 5' do local *adh9091* de *I. orientalis*.

[0461] O plasmídeo pGMEr126 (*supra*) foi digerido com enzima de restrição *EcoRI*, que excisou um fragmento de 4758 pares de base de interesse; enquanto que o plasmídeo pGMEr137 (*supra*) foi digerido com as enzimas de restrição *HpaI* e *NheI* criando um fragmento de 8400 pares de base. Os fragmentos tanto de 4758 pares de base quanto o de 8400 pares de base foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão de 1X TBE; as faixas foram excisadas do gel e purificadas usando o NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. CNB1 de *I. orientalis* foi cultivado e cotransformado com aproximadamente 500 ng dos fragmentos lineares tanto de 4758 pares de base quanto de 8400 pares de base como aqui descritos, resultando no transformante yGMEr009.

Exemplo 3A-13: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC), β -alanina aminotransferase (BAAT), e ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local *pdh*; e que expressam piruvato carboxilase (PYC), aspartato 1-descarboxilase (ADC), e aspartato aminotransferase (AAT) no local *adh9091*

[0462] Para aumentar a atividade de piruvato carboxilase (PYC) e aspartato aminotransferase (AAT) em uma cepa que já superexpressa uma aspartato aminotransferase (AAT), uma β -alanina aminotransferase (BAAT), e uma 3-HP desidrogenase (3-HPDH), a cepa yMhCt010 (*supra*) foi transformada com fragmentos lineares de pGMEr137 (*supra*) e pGMEr126 (*supra*) como descrito acima. Depois de duas rodadas de purificação de colônia única e crescimento excessivo, o DNA genômico foi preparado para o uso na PCR para verificar se a integração alvejada desejada ocorreu como descrito acima. O alvejamento correto dos fragmentos pGMEr137 e pGMEr126 ao local *adh9091* foi confirmado usando os iniciadores 0611814 e

0612055. O iniciador 0611814 recoze na extremidade 3' do promotor TDH3 de pGMEr126 e amplifica na direção 3'. O iniciador 0612055 recoze 3' da homologia de flanqueamento 3' de adh9091 presente em pGMEr126, de modo que a amplificação de um produto de PCR com este par de iniciador apenas ocorrerá se o DNA de integração alvejou para o local correto por intermédio da recombinação homóloga. A presença de uma faixa de aproximadamente 3066 pares de base de uma PCR contendo iniciadores 0611814 e 0612055 indica que a integração desejada dos fragmentos pGMEr126 e pGMEr137 ocorreu no local adh9091.

[0463] Depois de duas rodadas de purificação de colônia única e crescimento excessivo de vários transformantes independentes de yMhCt010 com fragmentos lineares de pGMEr137 e pGMEr126, o DNA genômico foi preparado para o uso na PCR para verificar se a integração alvejada desejada ocorreu como descrito acima. Três cepas independentemente isoladas que deram uma faixa de aproximadamente 3066 pares de base a partir de uma PCR contendo iniciadores 0611814 e 0612055 foram designados yMhCt020, GMErin010#2, e GMErin010#3. Estas cepas contiveram um polinucleotídeo (SEQ ID NO: 130) que codifica a ADC correspondente (SEQ ID NO: 17) em ambos dos locais pdc e um dos locais adh9091; um polinucleotídeo (SEQ ID NO: 141) que codifica a gabT correspondente (SEQ ID NO: 24) em ambos dos locais pdc; um polinucleotídeo (SEQ ID NO: 144) que codifica a 3-HPDH correspondente (SEQ ID NO: 129) em ambos dos locais pdc; um polinucleotídeo (SEQ ID NO: 1) que codifica a PYC correspondente (SEQ ID NO: 2) em um dos locais adh9091; e um polinucleotídeo (SEQ ID NO: 13) que codifica a AAT correspondente (SEQ ID NO: 14) em um dos locais adh9091 (ver a Tabela 24).

Tabela 24: Genótipos transformantes

Cepa	Cepa geradora	genótipo
yMhCt020	yMhCt010	adh9091Δ::(P_{DC}^{promo} -pycCNB1, $ENO1^{promo}$ -SaPanD(reverse), URA3, $TDH3^{promo-aat}$)/ADH9091
GMErin010 #2		

GMErin010 #3	pdcΔ::(<i>PDC_{promo}</i> -Opt.SaPanD, <i>ENO1_{promo}</i> -Opt.ScUGA1, <i>URA3Scar</i> , <i>TDH3_{promo}</i> -Opt.ScYMR226C)/pdcΔ::(<i>PDC_{promo}</i> -Opt.SaPanD, <i>ENO1_{promo}</i> -Opt.ScUGA1, <i>URA3Scar</i> , <i>TDH3_{promo}</i> -Opt.ScYMR226C) <i>ura3-ura3-</i>
--------------	---

[0464] As cepas yMhCt020, GMErin010#2, e GMErin010#3 foram cultivadas em frascos agitados e CFEs foram preparados e ensaiados quanto as atividades PYC, AAT e 3-HPDH como aqui descrito. Os resultados experimentais são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25: Dados de atividade de enzima transformante

Cepa	Gene Superexpresso	atividade PYC	atividade AAT	atividade de ADC	atividade 3-HPDH
MBin500 (control)	N/A	0,14	0,03	0,00	0,14
yMhCt008	ADC (SEQ ID NO: 130), gabT (SEQ ID NO: 141), 3-HPDH (SEQ ID NO: 144)	0,22	2,05	0,64	2,95
GMEr009-2	ADC (SEQ ID NO: 130), PYC (SEQ ID NO: 1), AAT (SEQ ID NO: 13)	1,15	24,62	0,05	0,07
yMhCt020	ADC (SEQ ID NO: 130), gabT (SEQ ID NO: 141), 3-HPDH (SEQ ID NO: 144),	2,74	35,02	0,56	1,68
GMErin010 #2	PYC (SEQ ID NO: 1), AAT (SEQ ID NO: 13),	1,97	40,32	0,59	1,87
GMErin010 #3		1,50	23,79	0,42	3,30

[0465] As cepas na Tabela 25 também foram analisadas pela SDS-PAGE como aqui descrito. MBin500 e GMEr009-2 mostraram uma faixa de proteína de ~64 kD que foi ausente nas quatro outras amostras. A massa destas proteínas é compatível com a sua identidade como a piruvato descarboxilase nativa em CNB1 de *I. orientalis*. As cepas yMhCt008, yMhCt020, GMErin010 #2, e GMErin010 #3 mostraram faixas em 53 kD e 29 kD. A massa destas proteínas é compatível com a massa das proteínas codificadas pelos genes UGA1 e YMR226c, respectivamente. As cepas GMEr009-2, yMhCt020, GMErin010 #2, e GMErin010 #3 todas mostraram faixas em 46,3 kD. A massa destas proteínas é compatível com a massa da proteína codificada pelo gene de AAT.

Exemplo 3A-14: Cepas de levedura que expressam a aspartato 1-descarboxilase (ADC) de quatro sequências de nucleotídeo em ambos os locais adh1202.

[0466] Um derivado de *ura3* de MeJi409-2 contendo quatro

cópias de nucleotídeos que codificam a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 (*supra*) foi isolado usando o protocolo de enlaçamento contrasseleção de FOA descrito acima. O DNA genômico de várias colônias resistentes a FOA da cepa precursora MeJi409-2 foi triado pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0611815 e 0611817. O iniciador 0611815 recoze no terminador RKI da construção à esquerda e amplifica na direção do promotor *ura3*. O iniciador 0611817 recoze no promotor TDH3 e amplifica na direção de volta para o cassete *ura3*. A presença de uma faixa de 828 pares de base indica a presença apenas do sítio de cicatriz *ura3* (um único promotor *ura3* deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 2,2 kbp indica a presença do cassete de promotor *ura3*ORF de Terminador URA3 de Promotor *ura3* de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. As reações de PCR com a DNA polimerase Crimson Taq® (New England Biolabs) foram realizadas como descrito acima. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora MeJi409-2, designada MeJi411, deu a faixa de 828 pares de base desejada.

Integração dos fragmentos à esquerda e à direita

[0467] O plasmídeo pMeJi310-2 foi digerido com *HpaI* e *SacII* e o plasmídeo pMeJi312-2 foi digerido com *EcoRI* e *SacII* como aqui descrito. Estes foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e as duas faixas de aproximadamente 5 kbp foram excisadas do gel e purificadas usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0468] MeJi411 foi transformado com o DNA de pMeJi310-2 e pMeJi312-2 digerido e o alvejamento e transformação dos locais corretos foram verificados pela PCR de Crimson Taq (New England Biolabs) como aqui descrita. Os iniciadores 0611225 e 0611632 produziram

uma faixa de aproximadamente 5 kbp; os iniciadores 0611815 e 0611632 produziu uma faixa de aproximadamente 6 kbp com o marcador ura, e uma faixa de 4,5 kbp sem. Os iniciadores 0611631 e 0612579 produziram uma faixa de aproximadamente 936 pares de base quando o local *adh1202* do tipo selvagem está ainda intacto (cepas que não mostraram esta faixa foram selecionadas). Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão foi designada MeJi412.

Exemplo 3A-15: Cepas de levedura que expressam quatro cópias de nucleotídeos que codificam uma aspartato 1-descarboxilase (ADC) no local *adh1202*, com duas cópias dos nucleotídeos que codificam a aspartato 1-descarboxilase (ADC) sob o controle de um promotor PDC e duas cópias sob o controle de um promotor TDH3.

[0469] Este exemplo descreve construções planejadas para incorporar quatro cópias de nucleotídeos que codificam a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 no local *adh1202* com duas cópias sob o controle do promotor PDC de *I. orientalis* e duas cópias sob o controle do promotor TDH3 de *I. orientalis*. Em um método similar a aquele descrito acima, uma construção à esquerda e uma à direita foram planejadas para permitir a recombinação homóloga no local *adh1202* da CNB1 de *I. orientalis*.

Construção de um fragmento à esquerda

[0470] O plasmídeo pMeJi310-2 (*supra*; ver a Figura 14) foi digerido com *XbaI* e *StuI* seguido pelo tratamento com CIP e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 6,7 kbp foi excisada do gel e purificada usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0471] O promotor PDC foi excisado de pMeJi310-2 pela digestão com *NotI* seguido por uma reação de enchimento com Klenow e

digestão subsequente com *NheI*. Uma faixa de aproximadamente 708 pares de base foi excisado do gel e purificado usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0472] Os 708 pares de base de fragmento purificado foi ligado dentro do vetor pMeJi310-2 de 6,7 kbp linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 1 µL do fragmento 6,7 kbp de pMeJi310-2, 1 ou 5 µL do fragmento de 708 pares de base de pMeJi310-2, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada durante a noite a 16° C e uma alíquota de 4 µL da reação foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37° C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando *ApaLI*. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi designado pMIBa137.

Construção de um fragmento à direita

[0473] O plasmídeo pMeJi312-2 (*supra*) foi digerido com *XbaI* e *StuI* seguido pelo tratamento com CIP e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 6,8 kbp foi excisada do gel e purificada usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0474] O promotor TDH3 foi excisado a partir de pMeJi312-2 pela digestão com *PmeI* e *NheI*. Uma faixa de aproximadamente 966 pares de base foi excisada do gel e purificada usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0475] Os 966 pares de base de fragmento purificado foram ligados dentro do vetor pMeJi312-2 de 6,8 kbp linearizado usando a T4 ligase

(New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 1 µL do fragmento de 6,8 kbp de pMeJi312-2, 1 ou 5 µL do fragmento de 966 pares de base de pMeJi312-2, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por aproximadamente 6 horas a 16°C e uma alíquota de 4 µL da reação foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando *SaII*. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi designado pMIBa136.

Integração do fragmentos à esquerda e à direita

[0476] Os plasmídeos pMIBa137 foram digeridos com *HpaI* e *SacII* e o plasmídeo pMIBa136 foi digerido com *EcoRI* e *SacII* como aqui descrito. Estes foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e as duas faixas de aproximadamente 5 kbp foram excisados do gel e purificados usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0477] A CNB1 de *I. orientalis* foi transformada com o DNA de pMIBa137 e pMIBa136 digerido e locais de alvejamento corretos e a transformação foi verificada pela PCR de Crimson Taq (New England Biolabs) como aqui descrita. Os iniciadores 0611717 e 0611631 produziram faixas de aproximadamente 2,5 kbp e 955 pares de base; os iniciadores 0611718 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 733 pares de base; os iniciadores 0612794 e 0611245 produziram uma faixa de aproximadamente 2,7 kbp; os iniciadores 0611225 e 0612795 produziram uma faixa de aproximadamente 4,2 kbp. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão foi designada MIBa351.

Remoção do marcador ura de MIBa351

[0478] Um derivado de ura de MIBa351 foi isolado como descrito acima. Os DNAs genômicos de várias colônias resistentes a FOA de MIBa351 foram triadas pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0611815 e 0611817. O iniciador 0611815 recoze no terminador RKI da construção à esquerda e amplifica na direção do promotor ura3. O iniciador 0611817 recoze no promotor TDH3 e amplifica de volta na direção do cassete ura3. A presença de uma faixa de 828 pares de base indica a presença apenas do sítio de cicatriz ura3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 2,2 kbp indica a presença do cassete do promotor ura3ORF de Terminador URA3 de Promotor ura3 de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. As reações de PCR com DNA polimerase Crimson Taq[®] (New England Biolabs) foram realizadas como descritas acima. As colônias resistentes a FOA que produziram o fragmento de 828 pares de base com os iniciadores acima foram testadas ainda com os iniciadores 0612794 e 0611245, produziram um produto de 2,7 kbp, e os iniciadores 0611815 e 0612795, produziram um produto de 4 kbp, para confirmar que as quatro cópias da sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 138 que codifica a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 permanecera intactas. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora MIBa351, designada MIBa353, deu o produto de PCR desejado com todos os 3 conjuntos de iniciador.

Construção de um fragmento de cassete de expressão reverso à direita

[0479] O plasmídeo pMIBa136 contém dois cassetes de expressão indo na orientação avançada. Para facilitar a triagem de cepas homozigotas, um novo plasmídeo foi construído onde os cassetes de

expressão de panDbl de pMIBa136 foram colocados na orientação reversa. O plasmídeo pMIBa136 (*supra*) foi digerido com *NotI* e *PmeI* seguido por uma reação de enchimento com Klenow e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. As faixas em aproximadamente 3,4 e 4,4 kbp foram excisadas do gel e purificadas usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de 4,4 kbp de pMIBa136 foi tratado com CIP e purificado usando o Kit de Purificação de PCR QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0480] O fragmento de 3,4 kbp purificado de pMIBa136 foi ligado dentro do vetor pMIBa136 de 4,4 kbp usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 1 µL do fragmento de 4,4 kbp de pMIBa136, 1 ou 5 µL do fragmento de 3,4 kbp de pMIBa136, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada durante a noite a 16°C e uma alíquota de 4 µL da reação foi transformado em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando *PacII* e *EcoRI*. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi designado pMIBa138.

Integração de fragmentos à esquerda e à direita

[0481] O plasmídeo pMIBa137 foi digerido com *HpaI* e *SacII* e o plasmídeo pMIBa138 foi digerido com *EcoRI* e *SacII* como aqui descrito. Estes foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e as duas faixas de aproximadamente 5 kbp foram excisadas do gel e purificadas usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de

acordo com as instruções do fabricante.

[0482] MIBa353 foi transformado com o DNA de pMIBa137 e pMIBa138 digerido e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o Kit pHire® Plant Direct PCR (Finnzymes) de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores 0611718 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 733 pares de base (para confirmar que a primeira integração ainda está presente); os iniciadores 0612367 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 960 pares de base (para confirmar a segunda cópia integrada); os iniciadores 0611631 e 0612579 produziram uma faixa de aproximadamente 936 pares de base se o local adh1202 do tipo selvagem ainda estiver presente (a falta desta faixa confirma a perda do local adh1202 do tipo selvagem). Duas cepas que deram as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão foram salvas e designadas MIBa355 e MIBa356.

Atividade de Aspartato 1-Descarboxilase em MeJi409-2, MeJi412, MIBa351 e MIBa355

[0483] As cepas MeJi409-2, MeJi412, MIBa351 e MIBa355 foram cultivadas em frascos agitados e CFE foram preparados e ensaiados para a atividade da aspartato 1-descarboxilase (ADC) como aqui descrito. Os resultados são mostrados na Tabela 26. A atividade para cada cepa é uma média de duas culturas em frasco agitado independentes. As cepas MeJi409-2, MeJi412, MIBa351 e MIBa355 também foram testadas em biorreatores quanto a produção de 3-HP, usando os métodos aqui descritos. Os resultados destes experimentos de biorreator também são mostrados na Tabela 26. De modo a considerar as diferenças na massa de célula nestas fermentações, o desempenho de produção de 3-HP mostrado na Tabela 26 é expresso como concentração de 3-HP por unidade de massa de célula (expressa como g/L de 3-HP/g/L de peso de célula seca). Os resultados mostram que conforme o nível de atividade de ADC nas células aumentou, o desempenho de produção

de 3-HP aumentou.

Tabela 26: Dados de Atividade de ADC Transformante e Produção de 3-HP

Cepa	Gene Superexpresso	Atividade de ADC	3-HP/DCW
MBin500	N/A	0	0
MeJi409-2	ADC (SED ID NO: 138)	0,629	0,19
MeJi412		1,151	0,43
MIBa351		0,659	0,32
MIBa355		1,173	0,52

Exemplo 3A-16: Construção de plasmídeo para expressar a piruvato carboxilase (PYC) no local PDC

[0484] O plasmídeo pANN28 que contém a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1 (que codifica a PYC de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 2) para a integração no local PDC foi construído como descrito abaixo.

[0485] As regiões flanqueadoras a montante e a jusante de PDC de *I. orientalis* foram amplificadas pela PCR usando DNA genômico como um padrão (Pfu polimerase, Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores oANN7 e oANN8 permitiram a incorporação de sítios de restrição únicos que flanqueiam a região a montante e os iniciadores oANN9 e oANN10 permitiram a incorporação de sítios de restrição únicos que flanqueiam a região a jusante. Os produtos de PCR foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 800 pares de base para cada produto de PCR foi excisado do gel e purificado usando um kit de extração de gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram clonados em vetores TOPO (Invitrogen) e transformados em células DH10B de *E. coli* eletrocompetentes (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela PCR de colônia com os mesmos iniciadores usados para criar os produtos de PCR. Os clones positivos foram confirmados ainda pelo sequenciamento. Um clone que produz a PDC correta no flanco a jusante foi designado pANN04. Um clone que produz a PDC correta no flanco a

montante foi designado pANN07.

[0486] O plasmídeo pANN04 foi digerido com *ApaI* e *SacI* (para o uso como vetor/cadeia principal); o plasmídeo pANN04 foi digerido com *NotI* e *SacI*; o plasmídeo pANN07 foi digerido com *NotI* e *ApaI*. Cada fragmento foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 3,5 kbp para o vetor, e aproximadamente 1 kbp para cada inserto foram excisados do gel e purificados usando um kit de extração em gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram ligados usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 49 ng do vetor, 120 ng do inserto a jusante, 41 ng do inserto a montante, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 30 minutos na temperatura ambiente e uma alíquota de 2 µL da reação foi transformada em células de *E. coli* eletrocompetentes OneShot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas de LB + Canamicina e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela PCR de colônia com iniciadores oANN7 e oANN10 (que produz uma faixa de aproximadamente 1,7 kbp). Um clone que produz a inserção correta foi designado pANN12.

[0487] A sequência codificadora PYC de *I. orientalis* (SEQ ID NO: 1) de pGMEr137 (*supra*) foi modificada pela mutagênese loco dirigida para eliminar três sítios de restrição *EcoRI* que não alteram a sequência de aminoácido da enzima codificada. O plasmídeo pGMEr137 foi usado como um padrão com iniciadores oANN13, oANN14 e oANN15 usado para a eliminação dos sítios de restrição mencionados acima usando um kit de mudança múltipla (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. Vários dos transformantes resultantes foram triados pela digestão de restrição

usando EcoRI. Os clones positivos foram confirmados ainda pelo sequenciamento. Um clone que produz a sequência codificadora *pyc* correta foi designado pANN14.

[0488] O plasmídeo pJY39 (Figura 29) foi digerido com XhoI e PacI; o plasmídeo pACN5 (*supra*; ver a Figura 19) foi digerido com XhoI e XbaI; o plasmídeo pANN14 foi digerido com XbaI e PacI. Cada fragmento foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 8 kbp para o vetor, aproximadamente 700 pares de base para o primeiro inserto, e aproximadamente 3,6 kbp para o segundo inserto que codifica a *PYC* foram excisado do gel e purificados usando um kit de extração de gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram ligados usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 51 ng do vetor, 49 ng do primeiro inserto, 210 ng do segundo inserto, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 30 minutos na temperatura ambiente e uma alíquota de 2 µL da reação foi transformada em células de *E. coli* eletrocompetentes OneShot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas de LB + Canamicina e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela PCR de colônia com iniciadores oJLJ57 e oJLJ43 (que produzem uma faixa de aproximadamente 1 kbp), iniciadores oJLJ45 e oANN16 (que produzem uma faixa de aproximadamente 730 pares de base), e iniciadores oANN20 e oJY45 (que produzem uma faixa de aproximadamente 1,2 kbp). Um clone que produz a inserção correta foi designado pANN15.

[0489] Os plasmídeos pANN12 e pANN15 foram digeridos com NotI. O plasmídeo pANN15 foi adicionalmente digerido com NcoI para

outro fracionamento da cadeia principal e separação melhorada de fragmento desejado. O pANN12 digerido foi purificado usando um kit Qiagen de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos NotI foram purificados pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito. As faixas de aproximadamente 5 kbp (de pANN12) e aproximadamente 6,3 kbp (de pANN15) foram purificadas em gel usando um kit de extração em gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0490] O produto purificado de pANN15 foi ligado dentro do vetor pANN12 linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 50 ng do vetor, 115 ng do inserto, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 1,5 h na temperatura ambiente e uma alíquota de 2 µL da reação foi transformada em células de *E. coli* eletrocompetentes OneShot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas de LB + Canamicina e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela PCR de colônia com os iniciadores oANN20 e oJY45 (que produzem uma faixa de aproximadamente 1,2 kbp). Os clones que produzem a inserção correta foram triados ainda pela digestão de enzima de restrição com SacI/EcoRI e com SacI/EcoRV de modo a diferenciar a orientação do inserto. Um clone que produz o marcador *ura3* próximo ao flanco de PDC a montante foi designado pANN27. Um clone que produz o marcador *ura3* próximo ao flanco de PDC a jusante foi designado pANN28.

Exemplo 3A-17: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC) de quatro sequências de nucleotídeo no local *adh1202* e piruvato carboxilase (PYC) no local *pdc*

[0491] Este exemplo descreve a construção de cepas de levedura que expressam quatro cópias de nucleotídeos que codificam a ADC

de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 no local adh1202 e um nucleotídeo que codifica a PYC de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 2 no local pdc.

Remoção do marcador ura de MeJi412

[0492] Um derivado de ura de MeJi412 foi isolado como descrito acima. Várias colônias resistentes a FOA de MeJi412 foram triadas pela PCR de colônia para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0611815 e 0611817. O iniciador 0611815 recoze no terminador RKI da construção à esquerda e amplifica na direção do promotor ura3. O iniciador 0611817 recoze no promotor TDH3 e amplifica de volta na direção do cassete ura3. A presença de uma faixa de 869 pares de base indica a presença apenas do sítio de cicatriz ura3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 2,6 kbp indica a presença do cassete promotor ura3ORF de Terminador URA3 de Promotor ura3 de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. As reações de PCR com o Kit Phire® Plant Direct PCR (Finnzymes) foram realizadas como descrito acima. As colônias resistentes a FOA que produziram o fragmento de 869 pares de base com os iniciadores acima foram testadas ainda com os iniciadores 0612794 e 0611817, produziram um produto de 3,8 kbp, e iniciadores 611815 e 612795, produziram um produto de 3,7 kbp, para confirmar que as quatro cópias da sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 138 que codifica a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 permaneceram intactas. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora MeJi412, designada MeJi413, deu o produto de PCR desejado com todos os 3 conjuntos de iniciador.

Integração de fragmento

[0493] O plasmídeo pANN28 (*supra*) foi digerido com AscI e SacI e purificado pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE. A faixa em aproximadamente 7,1 kbp foi excisada do gel e purificado usando

um kit de purificação em gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0494] A cepa MeJi413 foi transformada com o fragmento digerido e purificado de pANN28 e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR de colônia (Failsafe, mistura E, Epicenter) de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores oANN12 e oJLJ44 produziram uma faixa de aproximadamente 1 kbp; os iniciadores oANN11 e oANN16 produziram uma faixa de aproximadamente 1,3 kbp. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão foi designado yANN35.

[0495] Um derivado ura de yANN35 depois foi isolado como descrito acima. Várias colônias resistentes a FOA foram triadas pela PCR de colônia para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores oANN12 e oJY44. O iniciador oANN12 recoze fora da região flanqueadora a jusante. O iniciador oJY44 recoze ao terminador TAL. A presença de uma faixa de 1,5 kbp indica a presença apenas do sítio de cicatriz ura3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 2,8 kbp indica a presença do cassete de promotor ura3ORF de Terminador URA3 de Promotor ura3 de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. As reações de PCR com Failsafe DNA polimerase (Epicenter) foram realizadas como descritas acima. Os isolados positivos para este evento foram confirmados ainda pela PCR de colônia com iniciadores oANN16 e oANN11. Uma colônia resistente a FOA foi designada yANN37.

[0496] A cepa yANN37 foi transformada com os fragmentos digeridos e purificados de pANN28 e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR de colônia (Failsafe, mistura E, Epicenter) de acordo com as instruções do fabricante. A triagem

preliminar foi feita com os iniciadores oHJJ116 e oHJJ117 que são específicos para o gene PDC. Uma faixa de aproximadamente 500 pares de base indica a presença do gene e assim um resultado negativo para a integração desejada. Isolados que foram positivos para a deleção de PDC foram confirmados ainda com reações de PCR adicionais. Os iniciadores oANN11 e oANN16 produziram uma faixa de aproximadamente 1,3 kbp. Os iniciadores oANN12 e oJLJ44 produziram uma faixa de aproximadamente 1 kbp; os iniciadores oANN12 e oJY44 produziram uma faixa de aproximadamente 1,5 kbp e uma faixa de aproximadamente 2,9 kbp (correspondente ao primeiro e segundo eventos de integração respectivamente).

[0497] Adicionalmente, os eventos de integração anteriores no local *adh1202* foram confirmados pela PCR de colônia como descrito acima. Os iniciadores 0611631 e 0611245 produziram uma faixa de aproximadamente 3,8 kbp. Os iniciadores 0611245 e oNovo3 produziram uma faixa de aproximadamente 3 kbp. Os iniciadores 0611815 e 0612795 produziram uma faixa de aproximadamente 3,6 kbp. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão foi designada yANN41.

Exemplo 3A-18: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC) de quatro sequências de nucleotídeo no local *adh1202* e piruvato carboxilase (PYC) no local *pdv*

[0498] Este exemplo descreve a construção de cepas de levedura que expressam quatro cópias de nucleotídeos que codificam a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 no local *adh1202* (com duas cópias sob o controle de um promotor PDC e duas cópias sob o controle de um promotor TDH3) e um nucleotídeo que codifica a PYC de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 2 no local *pdv*.

*Remoção do marcador *ura* de MIBa355*

[0499] Um derivado ura de MIBa355 foi isolado como descrito acima. O DNA genômico de várias colônias resistentes a FOA de MIBa355 foi triado pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0611815 e 0611718. A presença de uma faixa de aproximadamente 500 pares de base indica a presença apenas do sítio de cicatriz *ura3* (um único promotor *ura3* deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores *URA3* na cepa precursora) como desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 1,9 kbp indicou a presença do cassete de promotor *ura3ORF* de Terminador *URA3* de Promotor *ura3* de *URA3* intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. A PCR foi realizada usando o kit pHire® Plant Direct PCR (Finnzymes) de acordo com as instruções do fabricante. As colônias resistentes a FOA que produziram o fragmento de aproximadamente 500 pares de base com os iniciadores acima foram testados ainda com iniciadores 0611631 e 0611245, produziram um produto de 3,5 kbp, e iniciadores 0611815 e 0611632, produziram um produto de 4,5 kbp, para confirmar que as quatro cópias da sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 138 que codifica a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 permaneceram intactas. Elas também foram testadas com PCR usando os iniciadores 0611815 e 0611817 para confirmar que a primeira modificação em *adh1202* foi presente. Estes iniciadores de PCR produziram um fragmento de 828 pares de base. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora MIBa355, designada MIBa357, deu o produto de PCR desejado com todos os quatro conjuntos de iniciador.

[0500] O plasmídeo pANN28 (*supra*) foi digerido com *AscI* e *SacI* e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. A faixa de aproximadamente 7,1 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0501] MIBa357 foi transformado com o DNA pANN28

digerido e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes). Os iniciadores 0611622 e 0611552 produziram uma faixa de aproximadamente 850 pares de base; os iniciadores 0611245 e 0612794 produziram uma faixa de aproximadamente 2,8 kbp; os iniciadores 0611815 e 0612795 produziram uma faixa de aproximadamente 3,9 kbp. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão foi designada McTs241.

[0502] Um derivado de ura de McTs241 depois foi isolado como anteriormente descrito. Várias colônias resistentes a FOA de McTs241 foram triadas pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0614233 e 0611554 e a falta de crescimento em placas de seleção ura menos. A presença de uma faixa de 4,6 kbp indicou a presença apenas do sítio de cicatriz ura3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 5,9 kbp indicou a presença do cassete de promotor ura3ORF de Terminador URA3 de Promotor ura3 de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. As reações de PCR usando O Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes) foram realizadas como descrito acima. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora McTs241 que teve o evento de enlaçamento desejado foi designado McTs247.

[0503] Para criar a integração homozigota McTs247 foi transformado com o DNA de pANN28 digerido e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes). Como uma primeira triagem os transformantes foram triados pela PCR com iniciadores 0611552 e 0611553 que devem produzir uma faixa de aproximadamente 850 pares de base apenas se o local pdc estiver intacto e assim a integração homozigota de PYC no

local pdc não ocorreu. Daqueles que foram negativos quanto a uma faixa desta PCR foram depois triados pela PCR adicional com iniciadores 0611555 e 0611554. Com estes iniciadores um produto deve apenas amplificar a faixa de 1,4 kbp se PDC estiver intacta e assim não um integração homozigota de PYC no local PDC. Outra triagem de transformantes foi feita pela PCR usando os iniciadores 0611622 e 0611552 que produzem uma faixa de aproximadamente 850 pares de base; os iniciadores 0611245 e 0612794 produziram uma faixa de aproximadamente 2,8 kbp; os iniciadores 0611815 e 0612795 produziram uma faixa de aproximadamente 3,9 kbp. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão foi designada McTs253.

Exemplo 3A-19: Atividade de PYC, Atividade de ADC e o desempenho de produção de 3-HP das cepas MeJi412, yANN35, yANN41, MiBa355, McTs241 e McTs253.

[0504] As cepas MeJi412, yANN35, yANN41, MiBa355, McTs241 e McTs253 foram cultivadas em frascos agitados e CFE foi preparado e ensaiadas quanto à atividade da piruvato carboxilase (PYC) e atividade de aspartato 1-descarboxilase (ADC) como aqui descritas. Os resultados são mostrados na Tabela 27. As cepas MeJi412, yANN35, yANN41, MiBa355, McTs241 e McTs253 também foram testadas em biorreatores para a produção de 3-HP, usando os métodos aqui descritos. Os resultados destes experimentos de biorreator também são mostrados na Tabela 27. De modo a considerar as diferenças na massa de célula nestas fermentações, o desempenho de produção de 3-HP mostrado é expresso como concentração de 3-HP por unidade de massa de célula (expresso como g/L de 3-HP/g/L de peso de célula seca). Os resultados mostram que conforme o nível de atividade de PYC nas células aumentou, o desempenho de produção de 3-HP aumentou.

Tabela 27: Atividade de PYC e ADC transformante e o desempenho de produção de 3-HP

Cepa	Gene Superexpresso	Atividade de PYC	Atividade	3-HP/DCW
------	--------------------	------------------	-----------	----------

			de ADC	
MeJi412	ADC (SED ID NO: 138)	6,8	1,151	0,43
yANN35	ADC (SED ID NO: 138) PYC (SEQ ID NO: 1)	47,2	1,090	0,64
yANN41	ADC (SED ID NO: 138) PYC (SEQ ID NO: 1)	49,0	1,263	1,30
MIba355	ADC (SED ID NO: 138)	6,9	1,173	0,52
McTs241	ADC (SED ID NO: 138) PYC (SEQ ID NO: 1)	24,8	1,119	0,76
McTs253	ADC (SED ID NO: 138) PYC (SEQ ID NO: 1)	55,5	1,347	1,30

Exemplo 3A-20: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC) de quatro sequências de nucleotídeo no local adh1202 e deleção de beta-alanina aminotransferase (BAAT)

[0505] Este exemplo descreve a construção e desempenho de cepas de levedura que expressam quatro cópias de nucleotídeos que codificam a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 no local adh1202 e a deleção do gene *I. orientalis* nativo que codifica a BAAT (PYD4) da SEQ ID NO: 20.

Construção de plasmídeo de deleção de BAAT (PYD4) de I. orientalis

[0506] O plasmídeo pMIba123 (*supra*) foi digerido com NotI, KpnI, ApaI e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Duas faixas de aproximadamente 3,6 kbp e 3,8 kbp foram excisados do gel e purificados usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. Estes dois pedaços compreenderam a cadeia principal do plasmídeo e o cassete de seleção ura com o gene de *S. cerevisiae* da 3-HPDH (YMR226c) da SEQ ID NO: 144.

[0507] Um produto de PCR para a homologia PYD4 de *I. orientalis* a montante foi gerado pela amplificação pela PCR usando DNA genômico MBin500 de *I. orientalis* preparado como anteriormente descrito usando os iniciadores 0613178 e 0613180. O pedaço de homologia PYD4 de *I. orientalis* a jusante foi preparado pela amplificação pela PCR a partir do DNA genômico MBin500 usando os iniciadores 0613179 e 0613181.

Cinquenta pmol de cada iniciador foi usado em uma reação de PCR contendo 0,5 µL de DNA genômico MBin500 como padrão, 0,2 mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Tampão de 1X Expand High Fidelity (Roche), 3,5 U de Mistura de Enzima Expand High Fidelity (Roche) em um volume final de 50 µL. A reação de amplificação foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® 5333 (Eppendorf) programado para um ciclo a 95°C por 3 minutos; e 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto. Depois dos ciclos, a reação foi incubada a 72°C por 5 minutos e depois esfriada a 10°C até processado. A faixa de aproximadamente 800 pares de base da PCR usando os iniciadores 0613178 e 0613180 e a faixa de aproximadamente 900 pares de base da PCR usando os iniciadores 0613179 e 0613181 foram purificadas pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. As faixas foram excisadas do gel e purificadas usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0508] O produto de PCR a montante PYD4, o produto de PCR a jusante PYD4, e o plasmídeo pMlBa123 digerido com NotI/KpnI/ApaI foram montados em uma reação com IN-FUSION HD® (Clontech Laboratories, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. Da reação In-FUSION 2 µL foram transformados em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de um período de recuperação, duas alíquotas de 100 µL da reação de transformação foram plaqueados em placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes putativos foram selecionados das placas de seleção e o DNA plasmídico foi preparado de cada um usando um BIOROBOT® 9600 (Qiagen). Os clones foram analisados pela digestão de restrição e sequenciamento. Um plasmídeo com a sequência correta foram verificados pelo sequenciamento e chamado de pMcTs61.

[0509] O plasmídeo pMcTs61 contém ainda o promotor PDC, o gene YMR226c de *S. cerevisiae*, e o terminador PDC. Para remover estes segmentos indesejados, pMcTs61 foi digerido com EcoRI e XhoI seguido pela adição de fragmento de Klenow para criar extremidades abruptas. O fragmento de 7,1 kbp foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. A faixa foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo abrupto digerido foi ligado junto usando T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). A mistura de reação conteve tampão de 1X T4 DNA ligase, 1 µL de T4 DNA ligase, 5 µL de DNA digerido e feito abrupto purificado de pMcTs61 em um volume total de 20 µL. A reação foi incubada na temperatura ambiente por 2 horas. Uma amostra de 10 µL da reação de ligação foi usada para transformar células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de um período de recuperação, duas alíquotas de 100 µL da reação de transformação foram plaqueadas em 150 mm de placas 2X YT suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes putativos foram selecionados das placas de seleção. Os clones foram analisados pela PCR de colônia. O DNA padrão de cada colônia foi preparado pela dissolução de 1 colônia em 50 µL de água estéril, aquecida a 95°C por 10 minutos, depois esfriada em gelo até o uso. Os iniciadores 0612911 e 0612909 foram usados para triar os transformantes. A reação de PCR com estes iniciadores pode amplificar uma faixa de 1 kbp se o plasmídeo foi correto. Dez pmol de cada iniciador foi usado em uma reação de PCR contendo 2 µL de padrão de DNA de colônia, 0,1 mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Tampão de Reação 1X Crimson Taq (New England Biolabs), 1 U de DNA Polimerase Crimson *Taq* (New England Biolabs) em um volume final de 20 µL. A reação de amplificação foi realizada em um EPPENDORF®

MASTERCICLOR® 5333 (Eppendorf) programado para um ciclo a 95°C por 3 minutos; e 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 3 minutos. Depois dos ciclos, a reação foi incubada a 72°C por 5 minutos e depois esfriada a 10°C até processada. De 5 µL da reação de PCR um fragmento de PCR de 1 kbp foi visualizado em um TAE a 1% - gel de agarose com brometo de etídio em tampão TAE. Um transformante com o produto de PCR do tamanho correto foi selecionado e chamado de pMcTs64 (Figura 3-0). O DNA plasmídico de pMcTs64 foi preparado usando um BIOROBOT® 9600 (Qiagen).

Deleção de BAAT nativo de I. orientalis (PYD4) de MeJi413 usando a construção pMcTs64

[0510] O plasmídeo pMcTs64 (*supra*; ver a Figura 3-0) foi digerido com ApaI, NcoI, KpnI e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. A faixa de aproximadamente 3,3 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0511] A cepa MeJi413 (*supra*) foi transformada com o DNA pMcTs64 digerido e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes). Os iniciadores 0612908 e 0613242 produziram uma faixa de aproximadamente 1,7 kbp; os iniciadores 0613241 e 0612909 produziram uma faixa de aproximadamente 1,5 kbp para confirmar a integração do cassete de deleção. Os iniciadores 0611815 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 4,2 kbp; os iniciadores 0611817 e 0611631 produziram uma faixa de aproximadamente 4,8 kbp para confirmar que o cassete ADC no local ADH1202 foi ainda intacto. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de deleção e cassete ADC foi designada McTs225.

[0512] Um derivado de ura de McTs225 foi depois isolado

como anteriormente descrito. Várias colônias resistentes a FOA de McTs225 foram triadas pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0612911 e 0612910. a presença de uma faixa de 1,1 kbp indica a presença apenas do sítio de cicatriz *ura3* (um único promotor *ura3* deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 2,5 kbp indica a presença do cassete de promotor *ura3*ORF de Terminador URA3 de Promotor *ura3* de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. Os iniciadores 0611815 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 4,2 kbp; os iniciadores 0611817 e 0611631 produziram uma faixa de aproximadamente 4,8 kbp para confirmar que o cassete ADC no local *adh1202* foi ainda intacto. As reações de PCR usando o Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes) foram realizadas como descrito acima. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora McTs225 que teve o evento de enlaçamento desejado foi designada McTs228.

[0513] Para criar uma deleção de homozigoto do gene nativo que codifica a BAAT de *I. orientalis* (PYD4) da SEQ ID NO: 20, McTs228 foi transformado com pMcTs64 digerido e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes). Dois conjuntos de iniciador foram usados para triar pela PCR quanto à deleção do local PYD4. Os iniciadores 0613550 e 0612910 produziram uma faixa de aproximadamente 700 pares de base apenas se o local PYD4 estiver intacto que indicaria que a deleção homozigótica de PYD4 não ocorreu. Adicionalmente transformantes foram triados com iniciadores 0612911 e 0613551 os quais produziram uma faixa de aproximadamente 600 pares de base se PYD4 não foi deletada. Os transformantes que foram negativos para o local PYD4 de *I. orientalis* foram triados ainda com iniciadores 0613242 e 0613243 que produzem uma faixa de aproximadamente 3,5 kbp e 2,1 kbp; os iniciadores 0612908 e 0613243

produziram uma faixa de aproximadamente 1,7 kbp; os iniciadores 0612909 e 0612911 produziram uma faixa de aproximadamente 950 pares de base. O cassette de ADC no local adh1202 foi confirmado estar ainda intacto com iniciadores 0611817 e 0611631 que produzem uma faixa de aproximadamente 4,8 kbp e iniciadores 611815 e 612712 que produzem uma faixa de aproximadamente 4,2 kbp. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassette de expressão foi designada McTs236.

[0514] Um derivado de ura de McTs236 foi depois isolado como anteriormente descrito. Várias colônias resistentes a FOA de McTs236 foram triadas pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0613242 e 0613243 que produzem uma faixa de aproximadamente 2,1 kbp. O cassette ADC no local ADH1202 foi confirmado estar ainda intacto com os iniciadores 0611245 e 0612794 que produzem uma faixa de aproximadamente 3 kbp e iniciadores 0611815 e 0612795 que produzem uma faixa de aproximadamente 3,6 kbp. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassette de expressão foi designada McTs245.

[0515] As cepas MlBa372 e McTs245 foram testadas em biorreatores quanto a produção de 3-HP, usando os métodos aqui descritos. De modo a considerar diferenças na massa de célula nestas fermentações, o desempenho de produção de 3-HP é expresso como concentração de 3-HP por unidade de massa de célula (expresso como g/L de 3-HP/g/L de peso de célula seca). A g/L de 3-HP/g/L de peso de célula seca para as cepas MlBa372 e McTs245 foram 1,66 e 0,16, respectivamente. Estes resultados sugerem que o gene PYD4 nativo em *I. orientalis* é responsável pela conversão de beta-alanina para malonato semialdeído, visto que a deleção deste gene levou a uma diminuição de 10 vezes no desempenho da produção de 3-HP.

Exemplo 3A-21: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC) de quatro sequências de nucleotídeo no local adh1202 e deleção de 3-HP desidrogenase (3-HPDH)

[0516] Este exemplo descreve a construção e desempenho de cepas de levedura que expressam quatro cópias de nucleotídeos que codificam a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 no local adh1202 e a deleção do gene de *I. orientalis* nativo que codifica a 3-HPDH da SEQ ID NO: 26.

Construção de plasmídeo de deleção de 3-HPDH de I. orientalis

[0517] O plasmídeo pMIBa123 (*supra*) foi digerido com NotI, KpnI, ApaI e o purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Duas faixas de aproximadamente 3,6 kbp e 3,8 kbp foram excisadas do gel e purificadas usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. Estes dois pedaços compreenderam a cadeia principal de plasmídeo e o cassete de seleção ura com o gene de *S. cerevisiae* da 3-HPDH da SEQ ID NO: 144.

[0518] Um produto de PCR para a homologia a montante de 3-HPDH de *I. orientalis* foi amplificado a partir do DNA genômico de MBin500 de *I. orientalis* preparado como anteriormente descrito usando os iniciadores 0613183 e 0613184. Um pedaço da homologia de 3-HPDH a jusante de *I. orientalis* foi amplificado a partir do DNA genômico de MBin500 de *I. orientalis* usando os iniciadores 0613185 e 0613186. Cinquenta pmol de cada iniciador foi usado em uma reação de PCR contendo 0,5 µl de DNA genômico MBin500 como padrão, 0,2 mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 2% de DMSO, tampão de 1X Phusion HF (Finnzymes), 2U de DNA Polimerase Phusion® Hot Start High-Fidelity (Finnzymes) em um volume final de 50 µl. A reação de amplificação foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® 5333 (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA) programado para um ciclo a 95°C por 3 minutos; e 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto. Depois dos ciclos, a reação foi incubada a 72°C por 5 minutos e

depois esfriada a 4°C até mais processado. A faixa de aproximadamente 640 pares de base da PCR dos iniciadores 0613183 e 0613184 e a faixa de aproximadamente 670 pares de base da PCR dos iniciadores 0613185 e 0613186 foram purificadas pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. As faixas foram excisadas do gel e purificadas usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0519] O produto de PCR a montante de 3-HPDH de *I. orientalis*, o produto de PCR a jusante de 3-HPDH de *I. orientalis*, e o plasmídeo pMlBa123 digerido com NotI/KpnI/ApaI foram montados em uma reação com IN-FUSION HD® (Clontech Laboratories, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. A partir da reação de In-FUSION 2 µL foram transformados nas células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de um período de recuperação, duas alíquotas de 100 µl da reação de transformação foram plaqueadas em placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes putativos foram selecionados das placas de seleção e o DNA plasmídico foi preparado a partir de cada um usando um BIOROBOT® 9600 (Qiagen). Os clones foram analisados pela digestão de restrição e sequenciamento. Um plasmídeo com a sequência correta foi verificado pelo sequenciamento e chamado de pMcTs60.

[0520] O plasmídeo pMcTs60 contém ainda o promotor PDC, o gene YMR226c de *S. cerevisiae*, e o terminador PDC. Para remover estes segmentos indesejados, pMcTs60 foi digerido com NotI e XbaI e a faixa de aproximadamente 5 kbp contendo as regiões de homologia 3-HPDH e a cadeia principal de plasmídeo foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. As faixas foram excisadas do gel e purificadas usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com

as instruções do fabricante. O cassete de seleção *ura3* foi amplificado com 2 reações de PCR uma com os iniciadores 0613416 e 0613417 e a outra com os iniciadores 0613418 e 0613419. Cinquenta pmol de cada iniciador foram usados em uma reação de PCR contendo 0,5 µL de DNA plasmídico pMcTs60 como padrão, 0,2 mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Tampão 1X Expand High Fidelity (Roche), 3,5 U de Mistura de Enzima Expand High Fidelity (Roche) em um volume final de 50 µL. A reação de amplificação foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® 5333 (Eppendorf Scientific, Inc.) programado para um ciclo a 95°C por 3 minutos; e 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto. Depois dos ciclos, a reação foi incubada a 72°C por 5 minutos e depois esfriada a 4°C até mais processada. A faixa de aproximadamente 700 pares de base da PCR dos iniciadores 0613416 e 0613417 e a faixa de aproximadamente 1 kbp da PCR dos iniciadores 0613418 e 0613419 foram purificadas pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. As faixas foram excisadas do gel e purificadas usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. A cadeia principal do plasmídeo contendo as regiões de homologia de 3-HPDH de *I. orientalis* e os produtos de PCR do cassete *ura3* foram montados em uma reação com IN-FUSION HD® (Clontech Laboratories, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. A partir da reação com In-FUSION 2 µL foram transformados em Células Super Competentes Solo Pack Gold (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de um período de recuperação, duas alíquotas de 100 µL da reação de transformação foram plaqueadas em placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes putativos foram selecionados das placas de seleção e o DNA plasmídico foi preparado a partir de cada uma usando um BIOROBOT® 9600 (Qiagen). Os clones foram analisados pela digestão de restrição e um plasmídeo com o padrão de

digestão de restrição correto foi chamado de pMcTs65 (Figura 3-1).

Deleção de 3-HPDH nativo de I. orientalis de MeJi413 usando a construção pMcTs65

[0521] O plasmídeo pMcTs65 (*supra*; ver a Figura 3-1) foi digerido com ApaI, Sph, KpnI e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. A faixa de aproximadamente 2,9 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0522] A cepa MeJi413 (*supra*) foi transformada com o DNA de pMcTs65 digerido e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes). Os iniciadores 0613034 e 0613035 produziram uma faixa de aproximadamente 2,7 kbp para confirmar a integração do cassete de deleção. Os iniciadores 0611815 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 4,2 kbp; os iniciadores 0611817 e 0611631 produziram uma faixa de aproximadamente 4,8 kbp para confirmar que o cassete ADC no local adh1202 foi ainda intacto. Uma cepa que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de deleção e cassete de ADC foi designada McTs229.

[0523] Um derivado ura de McTs229 foi depois isolado como anteriormente descrito. Várias colônias resistentes a FOA de McTs229 foram triadas pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0613034 e 0613241. A presença de uma faixa de 1,4 kbp indica a presença apenas do sítio de cicatriz ura3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto que uma faixa de aproximadamente 2,8 kbp indica a presença do cassete de promotor ura3-ORF, de Terminador URA3, de Promotor ura3, de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. A presença de uma faixa

de 1,9 kbp indica que o local do tipo selvagem está presente nestes transformantes desde que estes sejam heterozigotos para a deleção. Os iniciadores 0611815 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 4,2 kbp; os iniciadores 0611631 e 0612366 produziram uma faixa de aproximadamente 4,5 kbp para confirmar que o cassete ADC no local ADH1202 ainda estava intacto. As reações de PCR usando o Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes) foram realizadas como descrito acima. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora McTs225 que teve o evento de enlaçamento desejado foi designado McTs238.

[0524] Para criar uma deleção homozigota do gene nativo que codifica a 3-HPDH de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 26, McTs238 foi transformado com pMcTs65 digerido e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o Kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes). Dois conjuntos de iniciador foram usados para triar pela PCR quanto à deleção do local YMR226c. Os iniciadores 0613034 e 0613747 produziram uma faixa de aproximadamente 500 pares de base se o local 3-HPDH estivesse intacto para indicar que a deleção homozigota de 3-HPDH não ocorreu. Adicionalmente transformantes foram triados com os iniciadores 0613746 e 0613241 que produziram uma faixa de aproximadamente 660 pares de base se 3-HPDH não fosse deletada. Os transformantes que foram do tipo selvagem negativos quanto ao local de 3-HPDH de *I. orientalis* foram triados ainda com os iniciadores 0613034 e 0613241 que produzem uma faixa de aproximadamente 2,8 kbp e 1,4 kbp; os iniciadores 0612908 e 0613241 produziram uma faixa de aproximadamente 1,5 kbp; os iniciadores 0613034 e 0612909 produziram uma faixa de aproximadamente 1 kbp. O cassete ADC no local ADH1202 foi confirmado estar ainda intacto com os iniciadores 0611245 e 0612794 que produzem uma faixa de aproximadamente 3 kbp e iniciadores 0611815 e 0612795 que produzem uma faixa de aproximadamente 3,6 kbp. Uma cepa que teve as faixas esperadas para a integração apropriada

do cassete de expressão foi designada McTs244.

[0525] Um derivado ura de McTs244 depois foi isolado como anteriormente descrito. Várias colônias resistentes a FOA de McTs244 foram triadas pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0613034 e 0613241 que produzem uma faixa de aproximadamente 1,4 kbp. O cassete ADC no local ADH1202 foi confirmado estar ainda intacto com os iniciadores 0611245 e 0612794 que produzem uma faixa de aproximadamente 3 kbp e iniciadores 0611815 e 0612795 que produzem uma faixa de aproximadamente 3,6 kbp. Uma colônia resistente a FOA da cepa precursora McTs244 que teve o evento de enlaçamento desejado foi designada McTs259.

[0526] As cepas MIBa372 e McTs244 foram testadas em biorreatores para a produção de 3-HP, usando os métodos aqui descritos. De modo a considerar diferenças na massa de célula nestas fermentações, o desempenho de produção de 3-HP é expresso como concentração de 3-HP por unidade de massa de célula (expresso como g/L de 3-HP/g/L de peso de célula seca). O g/L de 3-HP/g/L de peso de célula seca para as cepas MIBa372 e McTs259 foram de 1,66 e < 0,1, respectivamente. Estes resultados indicam que o gene nativo da 3-HPDH em *I. orientalis* é responsável pela conversão de malonato semialdeído para 3-HP, visto que a deleção deste gene aboliu a produção de 3-HP.

Exemplo 3A-22: Cepas de levedura que expressam piruvato carboxilase (PYC), aspartato aminotransferase (AAT), β -alanina aminotransferase (BAAT), e ácido 3-hidroxipropiônico desidrogenase (3-HPDH) no local pdc; e aspartato 1-descarboxilase (ADC) a partir de quatro sequências de nucleotídeo no local adh1202

[0527] As construções adicionais foram planejadas para incorporar a sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 1 que codifica a PYC de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 2, a sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 13 que codifica a AAT de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 14, a sequência de

nucleotídeo SEQ ID NO: 142 que codifica a BAAT de *S. kluyveri* da SEQ ID NO: 21, e a sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 144 que codifica a 3-HPDH de *S. cerevisiae* da SEQ ID NO: 129 no local pdc de *I. orientalis* nas cepas que também contêm quatro cópias de nucleotídeos que codificam a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 no local adh1202. Em um método similar a aquele descrito acima, uma construção à esquerda e uma à direita foram planejadas para permitir a recombinação homóloga no local pdc de CNB1 de *I. orientalis*. Estas construções foram preparadas e transformadas em MIBa357 como descrito abaixo.

Construção de um fragmento à esquerda

[0528] A sequência do nucleotídeo SEQ ID NO: 13 que codifica a AAT de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 14 foi amplificada pela PCR usando o plasmídeo pGMEr126 (Figura 16) como um padrão de acordo com as instruções do fabricante (Pfu polimerase, Stratagene). Os iniciadores oANN1 e oANN2 permitiram a incorporação de sítios de restrição únicos que flanqueiam a sequência codificadora do gene. O produto de PCR foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito uma faixa de aproximadamente 1,3 kbp foi excisada do gel e purificada usando um kit de extração em gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR purificado foi digerido com ApaI e NruI e purificado em gel como aqui descrito.

[0529] O plasmídeo pGMEr135 (idêntico ao pGMEr136 acima, exceto que o inserto de promotor ENO1/terminador RKI está na orientação oposta) foi digerido com ApaI e NruI e purificado pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 11,7 kbp foi excisada do gel e purificada usando um kit de extração em gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0530] O produto de PCR de 1,3 kbp purificado foi ligado dentro do vetor linearizado pGMEr135 de 11,7 kbp usando a T4 ligase (New

England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 49,8 ng do vetor, 354 ng do inserto de 1,3 kbp, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 30 minutos na temperatura ambiente e uma alíquota de 2 µL da reação foi transformada em células DH10B eletrocompetentes da *E. coli* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas de LB + Canamicina e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela PCR de colônia com os iniciadores oHJ2 e oANN1 (que produzem uma faixa de aproximadamente 2,3 kbp) e iniciadores oANN5 e oANN6 (que produzem uma faixa de aproximadamente 877 pares de base). A sequência do fragmento aat amplificado pela PCR também foi confirmada. Um clone que produz a inserção e sequência corretas foi digerido com ApaI e NruI e purificado em gel como aqui descrito uma faixa de aproximadamente 1,3 kbp foi excisada do gel e purificada usando um kit de extração em gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0531] O plasmídeo pGMEr137 (*supra*; ver a Figura 18), contendo a sequência de nucleotídeo desejada SEQ ID NO: 1 que codifica a PYC de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 2, foi digerido com ApaI e NruI e purificado pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 11,7 kbp foi excisada do gel e purificada usando um kit de extração em gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0532] O produto de PCR de 1,3 kbp purificado foi ligado dentro do vetor pGMEr137 de 11,7 kbp linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 49,4 ng do vetor, 54 ng do inserto de 1,3 kbp, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England

Biolabs). A reação foi incubada por 30 minutos na temperatura ambiente e uma alíquota de 2 μ L da reação foi transformada em células eletrocompetentes de DH10B da *E. coli* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas LB + Canamicina e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela PCR de colônia com iniciadores oHJ2 e oANN1 (que produzem uma faixa de aproximadamente 2,3 kbp) e iniciadores oANN5 e oANN6 (que produzem uma faixa de aproximadamente 877 pares de base). Um clone que produz a inserção e sequência corretas foi designado pANN02.

Construção de um fragmento à esquerda com a sequência que codifica AAT na orientação oposta

[0533] O plasmídeo pANN02 foi digerido com PmeI e purificado pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito uma faixa de aproximadamente 10,3 kbp e uma faixa de aproximadamente 2,7 kbp foram excisadas do gel e purificadas usando um kit de extração em gel (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de vetor de 10,3 kbp de pANN2 foi desfosforilado com CIP (New England Biolabs) e purificado com um kit de purificação (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de 2,7 kbp de pANN02 foi ligado dentro do vetor de 10,3 kbp desfosforilado linearizado a partir de pANN02 usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 μ L composto de 36 ng do vetor, 28 ng do inserto, 1 μ L de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 μ L de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 30 minutos na temperatura ambiente e uma alíquota de 2 μ L da reação foi transformada em células eletrocompetentes TOP10 da *E. coli* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas de LB + Canamicina e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos

transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela PCR de colônia com iniciadores oJY44 e oHJ1 (que produzem uma faixa de aproximadamente 1,3 kbp). Um clone que produz a inserção correta foi designado pANN5.

Construção de um fragmento à direita

[0534] Uma construção à direita contendo duas regiões codificadoras ADC de *B. licheniformis* e o DNA flanqueador que alveja o local 3' de PDC de *I. orientalis* foi construído como segue. O plasmídeo pMhCt071 (um plasmídeo idêntico ao pMhCt077 acima exceto que a ORF de 3-HPDH de *S. cerevisiae* não é otimizada no códon para *I. orientalis*) foi digerida com PmeI e PacI, tratada com 10 unidades de fosfatase intestinal de bezerro (New England Biolabs), e purificada pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE, e uma faixa de aproximadamente 4,7 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II de acordo com as instruções do fabricante.

[0535] O plasmídeo pMeJi312-2 (*supra*; ver a Figura 15) foi digerido com PmeI e PacI para extrair dois cassetes de expressão de ADC de *B. licheniformis* e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 0,9% em tampão TAE. Uma faixa de aproximadamente 2,8 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II de acordo com as instruções do fabricante.

[0536] O fragmento contendo as regiões codificadoras duais de ADC de *B. licheniformis* de pMeJi312-2 foi depois ligado dentro do fragmento de vetor pMhCt071 linearizado em uma reação de ligação (20 µL) contendo tampão de ligação 1X Quick (New England Biolabs), 1 µL de fragmento de 4,7 kbp de vetor pMhCt071, 3 µL do inserto de 2,8 kbp de pMeJi312-2, e 1 µL de Quick T4 DNA ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi incubada por 5 min na temperatura ambiente, e depois o tubo foi colocado em gelo. 5 uL desta reação foram usados para transformar

Células SuperCompetentes SoloPack Gold (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+ amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a ligação apropriada dos fragmentos desejados pela digestão com ApaLI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi mantido e designado pMhCt110.

[0537] O plasmídeo pMhCt110 foi digerido com XbaI e PacI seguido pelo tratamento com CIP e purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 7,1 kbp foi excisada do gel e purificada usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0538] A sequência codificadora de 3-HPDH de *S. cerevisiae* otimizada no códon da SEQ ID NO: 144 foi excisada de pMiBa123 (*supra*) pela digestão com XbaI e PacI e purificada pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 814 pares de base foi excisada do gel e purificada usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de 814 pares de base purificado foi ligado dentro do fragmento de 7,1 kbp de pMhCt110 usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 1 µL do pMhCt110 digerido, 1 ou 7 µL do fragmento de 814 pares de base de pMiBa123, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 30 minutos na temperatura ambiente e uma alíquota de 4 µL da reação foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados durante o fim de semana na temperatura ambiente. Vários dos transformantes

resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando 2 combinações de enzimas XbaI e PacI e AscI e PacI. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto de cada digestão foi designado pMIBa142.

[0539] O plasmídeo pMIBa142 foi digerido com AscI seguido por uma reação de enchimento com Klenow e digestão subsequente com NheI e tratamento com CIP. A digestão foi purificada pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 7,5 kbp foi excisada do gel e purificada usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0540] A sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 142 que codifica a BAAT de *S. kluyveri* da SEQ ID NO: 21, foi excisada de pMIBa124 (*supra*) pela digestão com PacI seguida por uma reação de enchimento com Klenow e digestão subsequente com XbaI. A digestão foi purificada pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 1,4 kbp foi excisada do gel e purificada usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0541] O fragmento de 1,4 kbp purificado de pMIBa124 foi ligado dentro do fragmento de 7,5 kbp de pMIBa142 usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 1 µL do pMIBa142 digerido, 7 µL do fragmento 1,4 de pMIBa124, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 2,5 horas a 16°C e a ligação inteira foi transformada em células Sure (Agilent) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubados durante a noite a 37° C. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de

restrição com *StuI* e *PmeI*. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi designado pMiBa144.

Integração de um fragmento à esquerda e à direita em MiBa357

[0542] O plasmídeo pANN5 foi digerido com *NotI* e *NheI* e o plasmídeo pMiBa144 foi digerido com *NotI* como aqui descrito. Estes foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e o fragmento de 8,2 kbp de pANN5 e o fragmento de 6 kbp de pMiBa144 foram excisados do gel e purificados usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0543] MiBa357 foi transformado com o pANN5 e DNA de pMiBa144 e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o kit pHire® Plant Direct PCR (Finnzymes) de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores 0611552 e 0613695 produziram uma faixa de aproximadamente 4,1 kbp (para confirmar a integração na metade esquerda no local *pdc*); os iniciadores 0612358 e 0611554 produziram uma faixa de aproximadamente 2,5 kbp (para confirmar a integração da metade direita no local *pdc*); 0611245 e 0611631 produziram uma faixa de aproximadamente 3,5 kbp (para confirmar que a integração de 4X ADC na metade esquerda permaneceu no local *adh1202*); e os iniciadores 0611815 e 0611632 produziram uma faixa de aproximadamente 4,6 kbp (para confirmar que a integração de 4X ADC na metade direita permaneceu no local *adh1202*). Um isolado que deu as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão no local *pdc* e reteve o cassete de expressão no local *adh1202* foi salvo e designado MiBa360.

Remoção de marcador ura de MiBa360

[0544] Um derivado ura de MiBa360 foi isolado como descrito acima. Os DNAs genômicos de várias colônias resistentes a FOA de MiBa360 foram triados pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com

iniciadores 0611815 e 0613689. A presença de uma faixa de aproximadamente 1,9 kbp indica a remoção do marcador ura com o sítio de cicatriz ura3 (um único promotor ura3 deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto uma faixa de aproximadamente 3,3 kbp indica a presença do cassete de promotor ura3ORF de Terminador URA3 de Promotor ura3 de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. A PCR foi realizada usando o kit pHire[®] Plant Direct PCR (Finnzymes) de acordo com as instruções do fabricante. Duas colônias resistentes a FOA que produziram o fragmento de aproximadamente 1,9 kbp com os iniciadores acima foram salvas e designadas MIBa363 e MIBa364.

Construção de um fragmento de cassete de expressão reversa à direita

[0545] O plasmídeo pMIBa144 contém os cassetes de expressão de ADC e 3-HPDH desejados indo na orientação avançada. Para facilidade de triagem de cepas homozigotas, um novo plasmídeo foi construído onde o cassete de expressão de ADC de pMIBa144 foi colocado na orientação reversa. O plasmídeo pMIBa144 (*supra*) foi digerido com StuI e PmeI purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. As faixas em aproximadamente 6,1 kbp e 2,8 kbp foram excisadas do gel e purificadas usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK[®] (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de 6,1 kbp de pMIBa144 foi tratado com CIP e purificado usando o Kit de Purificação pela PCR QIAQUICK[®] (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0546] O fragmento de 2,8 kbp purificado de pMIBa144 foi ligado dentro do vetor de 6,1 kbp de pMIBa144 linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 1 µL do fragmento de 6,1 kbp de pMIBa144, 7 µL do fragmento de 2,8 kbp de pMIBa144, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP

(New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 4 horas a 16°C e uma alíquota de 4 µL da reação foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando SphI e XbaI. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi designado pMIBa146.

Integração de um fragmento à esquerda e à direita em MIBa363

[0547] O plasmídeo pANN5 foi digerido com NotI e NheI e o plasmídeo pMIBa146 foi digerido com NotI como aqui descrito. Estes foram purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e o fragmento de 8,2 kbp de pANN5 e o fragmento de 6,2 kbp de pMIBa146 foram excisados do gel e purificados pelo Kit de Purificação pela PCR QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0548] MIBa363 foi transformado com o DNA de pANN5 e pMIBa144 digerido e os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o Kit pHire® Plant Direct PCR (Finnzymes) ou Kapa Robust DNA polimerase de acordo com as instruções do fabricante. Para confirmar as integrações no local *pdc*, os seguintes pares de iniciador foram usados. Os iniciadores 0613689 e 0611815 produziram uma faixa de aproximadamente 1,9 kbp; os iniciadores 0612366 e 0611554 produziram uma faixa de aproximadamente 2,5 kbp; 0613688 e 0611815 produziram uma faixa de aproximadamente 3,2 kbp; 0611622 e 0611552 produziram uma faixa de aproximadamente 945 pares de base. Para checar as integrações em *adh1202* os seguintes pares de iniciador foram usados. Os iniciadores 0611245 e 0612794 produziram uma faixa de aproximadamente 2,8 kbp e os iniciadores 0611815 e 0612795 produziram uma faixa de aproximadamente

3,9 kbp. Dois isolados que deram as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão no local *pdv* e retiveram o cassete de expressão no local *adh1202* foram salvos e designados MIBa372 e MIBa373.

*Remoção de marcador *ura* de MIBa372*

[0549] Um derivado *ura* de MIBa372 foi isolado como descrito acima. Os DNAs genômicos de várias colônias resistentes a FOA de MIBa372 foram triados pela PCR para o evento de enlaçamento desejado com iniciadores 0611815 e 0613688. A presença de uma faixa de aproximadamente 2,1 kbp indica a remoção do marcador *ura* com o sítio de cicatriz *ura3* (um único promotor *ura3* deixado para trás depois da recombinação homóloga entre os dois promotores URA3 na cepa precursora) como desejado, enquanto uma faixa de aproximadamente 3,3 kbp indica a presença do cassete de promotor *ura3*ORF de Terminador URA3 de Promotor *ura3* de URA3 intacto, indicando que o evento de recombinação desejado não ocorreu. As colônias resistentes a FOA de MIBa372 também foram triadas pela PCR com iniciadores 0611815 e 0613689 (amplifica fragmento de 1,9 kbp) para confirmar a modificação do primeiro cromossoma e 0611552 e 0611553 (amplifica fragmento de 850 pares de base se o local *pdv* está presente) para confirmar a perda do local *pdv*. A PCR foi realizada usando o kit pHire® Plant Direct PCR (Finnzymes) de acordo com as instruções do fabricante. Uma colônia resistente a FOA que produziu o fragmento de aproximadamente 1,9 kbp com 0611815 e 0613689, mas não amplificou os fragmentos com 0613688 e 0611815, ou com 0611552 e 0611553 foi salva e designada MIBa375. O genótipo de MIBa375 é mostrado na Tabela 28.

Tabela 28: Genótipo Transformante

Cepa	Genótipo
MIBa375	$adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.Blpand PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.Blpand Ura3Scar TDH3}_{\text{promo}} \text{Opt.Blpand TDH3}_{\text{promo}} \text{Opt.Blpand})/adh1202\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.Blpand PDC}_{\text{promo}}\text{-Opt.Blpand Ura3Scar [TDH3}_{\text{promo}} \text{Opt.Blpand TDH3}_{\text{promo}} \text{Opt.Blpand}] \text{reverse})$ $pdv\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-CNB1pyc ENO1}_{\text{promo}}\text{-CNB1aat Ura3Scar TDH3}_{\text{promo}}\text{-OptSkPYD4 PGK1}_{\text{promo}}\text{-OptSc YMR226c/ pdv}\Delta::(\text{PDC}_{\text{promo}}\text{-CNB1pyc ENO1}_{\text{promo}}\text{-CNB1aat Ura3Scar TDH3}_{\text{promo}}\text{-OptSkPYD4 PGK1}_{\text{promo}}\text{-OptSc YMR226c})$

	OptScYMR226c ura3-/ura3-
--	-----------------------------

Exemplo 3A-23: Cepas de levedura deletadas quanto ao gene de glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPD).

Deleção do gene de GPD na cepa MlBa375

[0550] Construções adicionais foram planejadas para deletar ambas as cópias do gene de glicerol 3-fosfato desidrogenase (SEQ ID NO: 117, que codifica a GPD da SEQ ID NO: 118) do genoma da *I. orientalis* hospedeiro. Estas construções contiveram aproximadamente 1003 pares de base de sequência de nucleotídeo homóloga com a sequência a montante do gene de GPD e aproximadamente 852 pares de base da sequência homóloga com a sequência a jusante do gene de GPD, com um cassete marcador de T_{PDC}-URA3 (terminador de Promotor PDC de gene de URA3 de Terminador URA3de Promotor ura3 de URA3) clonados entre eles.

[0551] As regiões a montante e a jusante de *GPD* foram amplificadas a partir do DNA genômico de CNB1 de *I. orientalis* usando *Pfu* DNA polimerase como pelas especificações do fabricante. A região a montante conteve um sítio *ApaI*; isto foi eliminado pela PCR usando iniciadores de sobreposição planejados com um desemparelhamento para um dos nucleotídeos na sequência de reconhecimento *ApaI*. Os pares de iniciador oACN48/oACN51 e oACN49/oACN50 foram usados para amplificar estes dois fragmentos de sobreposição para a região a montante. Estes produtos de PCR foram separados e excisados de um gel de agarose a 1% e purificados usando um Kit de extração em gel Qiaquick (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, e foram usados como padrão para uma segunda rodada de PCR com iniciadores oACN48/oACN49 (tendo os sítios *ApaI* avançado/ *NotI* reverso). A região a jusante foi amplificada com os iniciadores oACN52/oACN53 (tendo os sítios *NotI* avançado/ *SacI* reverso) a partir do DNA genômico de *I. orientalis* usando *Pfu* DNA polimerase como pelas especificações do fabricante. Ambos os produtos de PCR foram purificados

em gel e clonados separadamente dentro do vetor pCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen). Os isolados foram confirmados ter o inserto desejado pela digestão de restrição de DNA plasmídico, e foram verificados pelo sequenciamento. O vetor pACN58 conteve o fragmento clonado a montante e pACN59 conteve o fragmento a jusante. O plasmídeo pACN58 foi digerido com *Apal/NotI* para liberar o flanco a montante, o plasmídeo pACN59 foi digerido com *SacI/NotI* para liberar o flanco a jusante, e pACN59 foi digerido com *Apal/SacI* para fornecer a cadeia principal de vetor. Os três fragmentos desejados foram separados em um gel de agarose a 1%, excisado e purificado, e ligado em uma reação de ligação de 3 pedaços usando a T4 ligase (New England Biolabs). A reação de ligação foi transformada nas células eletrocompetentes da *E.coli* TOP10 e os transformantes foram confirmados pela digestão de restrição de DNA plasmídico. Durante este procedimento, um sítio *SacI* adicional na região a jusante foi detectado, que resultou em uma região a jusante de 853 pares de base (como oposto a 1 kbp). Dois isolados com os insertos desejados foram chamados de pACN62 e pACN63.

[0552] O cassete *T_{PDCI}-URA3* foi isolado do vetor pJLJ8 (Figura 3-2) usando uma digestão com *NotI* e purificação em gel. Este fragmento foi depois ligado em pACN62 (*supra*) que foi digerido com *NotI* e desfosforilado, e a ligação foi transformada em células eletrocompetentes DH10B da *E. coli* (Invitrogen). As colônias com o inserto *URA3* foram confirmadas pela PCR usando os iniciadores oACN48/oJLJ44 e oACN48/oJLJ46. O iniciador oJLJ44 recoze no final do promotor a jusante de *URA3* e amplifica fora do cassete *T_{PDCI}-URA3*. O iniciador oJLJ46 recoze na extremidade 5' do terminador PDC e amplifica fora do cassete *T_{PDCI}-URA3*. O vetor pHJJ56 contém a região *GPD* a jusante voltada para *URA3* e pHJJ57 contém a região *GPD* a montante voltada para *URA3*.

[0553] Os plasmídeos pHJJ56 e pHJJ57 foram linearizados pela digestão com *KpnI* e *Apal* e os fragmentos contendo o cassete de deleção

foram purificado pela extração em gel. pHJJ56 linearizado foi transformado dentro da cepa ura MlBa375. Colônias únicas foram novamente riscadas para a purificação e testadas pela PCR quanto a deleção de *GPD* desejada usando os iniciadores oJLJ44, oJLJ46, oACN54 e oACN55. As células foram lisadas em 40 uL de tampão Y-Lise e 2 uL de Zymoliase (ZymoResearch) a 37°C por 30 minutos e 1 uL da reação de lise usado em uma reação de 25 uL de PCR. As reações de PCR usaram a Failsafe DNA polimerase e Tampão E de acordo com as especificações do fabricante, com uma temperatura de recozimento de 55°C e o perfil de ciclagem que segue: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos; 29 ciclos cada um a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1,5 minuto; e 1 ciclo a 72°C por 3 minutos. As cepas com uma cópia do silenciamento *GPD* produziu faixas de aproximadamente 0,9 e 1,2 kbp e foram chamadas yHJN1 e yHJN2.

[0554] As cepas yHJN1 e yHJN2 foram cultivadas durante a noite em meio YPD e plaqueadas em meio ScD-2X FOA para selecionar para perda do marcador *URA3*. As colônias únicas foram purificadas em YPD e embutidas em meios ScD-ura e YPD para confirmar o fenótipo ura. As colônias ura foram confirmadas ter retido o silenciamento usando a mesma reação de PCR usada para confirmar a primeira integração. Um derivado de ura de yHJN1 foi chamado de yHJN3 e um derivado de ura de yHJN2 foi chamado de yHJN4.

[0555] pHJJ57 linearizado foi transformado em yHJN3 e yHJN4 e colônias únicas foram purificadas em meio ScD-ura. A presença de duas cópias do silenciamento *GPD* foi confirmada pela PCR usando os iniciadores oJLJ44, oACN54, e oACN55 em uma reação, e os iniciadores oJLJ46, oACN54, e oACN55 em uma segunda reação. O iniciador oACN54 recoze a uma região de aproximadamente 37 pares de base a montante da sequência flanqueadora a montante para *GPD*, enquanto oACN55 recoze a uma região de aproximadamente 24 pares de base a jusante do flanco a jusante. A primeira reação produz faixas de aproximadamente 900 e 1050

pares de base se ambas as cópias do *GPD* são deletadas, e a última reação produz faixas de aproximadamente 1025 e 1200 pares de base. As colônias com duas cópias do silenciamento *GPD* cresceram mais lentamente nas placas ScD-ura do que aquelas com uma cópia única da deleção. As cepas tendo ambas as cópias do gene de *GPD* deletadas foram chamadas de yHJN7 (derivada da yHJN3) e yHJN8 (derivada da yHJN4).

[0556] As cepas MIBa372, yHJN7 e yHJN8 foram testadas em biorreatores quanto a produção de glicerol, usando os métodos aqui descritos. A cepa MIBa372 produziu 29,5 g/L de glicerol em 48 horas. Nenhum glicerol detectável foi produzido pelas cepas yHJN7 ou yHJN8 durante a fermentação. A ausência de glicerol no caldo de fermentação final pode fornecer vantagens na recuperação e purificação de 3-HP do caldo de fermentação.

3A-24: Cepas de levedura que expressam aspartato 1-descarboxilase (ADC) a partir de quatro sequências de nucleotídeo no local adh1202, 3-HP desidrogenase (3-HPDH) no local adh9091 e deleção de 3-HP desidrogenase nativa (3-HPDH)

Construção de plasmídeo para integração de 3-HPDH de I. orientalis no local adh9091

[0557] As sequências de nucleotídeo da SEQ ID NO: 25 que codificam a 3-HPDH de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 19 que codificam a BAAT de *I. orientalis* (PYD4) da SEQ ID NO: 20 foram amplificadas a partir do DNA genômico MBin500 de *I. orientalis* preparado como anteriormente descrito usando os iniciadores 0611954 e 0611957 (para 3-HPDH) ou 0611997 e 0611998 (PYD4). O iniciador 0611954 adiciona uma sequência kozak (TAAA) e o sítio *NheI* à extremidade 5', e o iniciador 0611957 adiciona um sítio *PacI* à extremidade 3' da 3-HPDH durante a amplificação. O iniciador 0611997 adiciona uma sequência kozak (TAAA) e sítio *PacI* à extremidade 5', e o iniciador 0611998 adiciona um sítio *PacI* à

extremidade 3' de PYD4 durante a amplificação. Cinquenta pmol de cada iniciador foram usados em uma reação de PCR contendo 50 ng de DNA genômico MBin500 como padrão, 0,2 mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Tampão 1X Expand High Fidelity (Roche), e 2,6 unidades de Expand High Fidelity DNA Polimerase (Roche) em um volume final de 50 µL. A PCR foi realizada em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific) programado para um ciclo a 95°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos cada um a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto (3-HPDH PCR) ou 2 minutos (PYD4 PCR), com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A seguir da termociclagem, os produtos de reação da PCR foram separados pela eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE onde um produto de PCR de 3-HPDH de aproximadamente 831 pares de base ou PYD4 de 1,4 kbp foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Cinco µl da 3-HPDH ou PYD4 purificados foram clonados em pCR2.1 (Invitrogen) usando um Kit de Clonagem TOPO-TA (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As transformações foram plaqueadas em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados pela digestão com *EcoRI*. Os clones que produzem o tamanho de inserto desejado foram confirmados estar corretos pelo sequenciamento de DNA. Um clone contendo 3-HPDH foi designado pMBin190, e um outro contendo PYD4 foi designado pMBin193.

[0558] O plasmídeo pMBin193 foi digerido com *XbaI* e *PacI* e conduzido em um gel a 1,0% de agarose em tampão TAE onde a faixa de 1,4 kbp de PYD4 foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento PYD4 digerido foi ligado dentro do plasmídeo pMBa107 linear restringido por *XbaI* e *PacI* (*supra*) usando T4 DNA ligase. O produto de ligação foi transformado em One Shot® TOP10 quimicamente

competentes células *E. coli* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados pela digestão com *Sna*BI ou *Eco*RI. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi designado pMBin203. O plasmídeo pMBin203 contém sítios *Not*I que flanqueiam os cassete de expressão que seguem: promotor e terminador PDC a montante e a jusante da PYD4 CDS, o promotor *ura3*, a ORF de URA3, e o terminador URA3 seguido pelo promotor *ura3*.

[0559] O plasmídeo pMBin203 foi digerido com *Not*I e separado em um gel a 1,0% de agarose em tampão TAE onde o fragmento de aproximadamente 4,1 kbp (contendo o promotor PDC, PYD4 CDS, o terminador PDC, e o marcador de seleção de URA3) foi excisado do gel e purificado usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo pHJJ27 (contendo regiões de homologia 5' e 3' ao local *adh9091*; ver a Figura 21) foi digerido com *Not*I, tratado com CIP e separado em um gel a 1,0% de agarose em tampão TAE onde o plasmídeo linear de aproximadamente 5,7 kbp foi purificado como descrito acima. O fragmento de pMBin203 foi depois ligado dentro do pHJJ27 restrito com *Not*I usando T4 DNA ligase como descrito acima. O produto de ligação foi transformado em células da *E. coli* quimicamente competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT + amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados pela digestão com *Pst*I. Um clone que produz os tamanhos de faixa desejados foi designado pMBin204. O plasmídeo pMBin204 permite o alvejamento de PYD4 ao local *adh9091*.

[0560] A sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 25 que codifica a 3-HPDH de *I. orientalis* da SEQ ID NO: 26 foi removida do plasmídeo pMBin190 (*supra*) pela digestão com *Nhe*I e *Pac*I e purificada pela

eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 827 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo pMBin204 (*supra*) foi digerido com XbaI e PacI e purificado pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 8,4 kbp foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0561] O produto de gene de 3-HPDH purificado de aproximadamente 827 pares de base da *I. orientalis* acima foi ligado dentro do vetor pMBin204 de 8,4 kbp linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 20 µL composto de 1 µL do vetor de 8,4 kbp, 10 µL do inserto de 827 pares de base, 2 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 18 horas a 16°C e uma alíquota de 10 µL da reação foi transformada em células One Shot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de um período de recuperação, duas alíquotas de 100 µL da reação de transformação foram plaqueadas em placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes putativos foram selecionados das placas de seleção e o DNA plasmídico foi preparado de cada um usando um BIOROBOT® 9600 (Qiagen). Os clones foram analisados pela digestão de restrição e um plasmídeo com o padrão de digestão de restrição correto foi designado pMcTs90.

Construção de plasmídeo para a integração de 3-HPDH de S. cerevisiae no local adh9091

[0562] A sequência de nucleotídeo de 826 pares de base do tipo selvagem que codifica a 3-HPDH de *S. cerevisiae* da SEQ ID NO: 129

foi amplificada pela PCR a partir do DNA genômico JGI69 e corrigida com um sítio *XbaI* na extremidade 5' do gene e um sítio *PacI* na extremidade 3' do gene. A reação de amplificação foi realizada usando Platinum® *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Uma reação de PCR Master contendo 1,125 µL de DNA genômico de *S. cerevisiae*, 112,5 pM de cada um dos iniciadores 611191 e 611199, 1X tampão de amplificação *Pfx* (Invitrogen), 2 mM de MgSO₄, 0,2 mM de mistura de dNTP, 5 Unidades de Platinum® *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 200 µL. A mistura foi aliquoteada em oito tubos e a PCR de gradiente realizada. As reações de amplificação foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCICLOR® (Eppendorf Scientific Inc.) programado para 1 ciclo a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos cada um a 95°C por 30 segundos, Gradiente de 40 a 55°C por 30 segundos, e 72°C por 2 minutos; e 1 ciclo a 72°C por 3 minutos.

[0563] O produto de gene de PCR de YMR226c de 826 pares de base do tipo selvagem foi purificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE como aqui descrito. Um fragmento de aproximadamente 826 pares de base foi excisado do gel e extraído da agarose usando um Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen). O produto de PCR foi digerido durante a noite a 37°C com *XbaI* e *PacI* depois purificado usando o Kit de purificação de PCR QIAQUICK® (Qiagen).

[0564] O plasmídeo pMIBa100 (*supra*) foi digerido com *XbaI* e *PacI* seguido pelo tratamento com CIP resultante em um fragmento linear de aproximadamente 6,8 kbp. A digestão foi purificada usando o Kit de purificação pela PCR QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0565] O fragmento de PCR de 826 pares de base YMR226c purificado e digerido foi ligado dentro do vetor pMIBa100 de 6,8 kbp linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de

reação total de 10 µL composto de 1 µL do fragmento de pMIBa100 de 6,7 kbp, 1 µL ou 7 µL do produto de PCR YMR226c de 826 pares de base, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por aproximadamente 4 horas a 16°C e a reação inteira foi transformada em células Sure quimicamente competentes (Aglient) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas 2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando *XbaI* e *PacI*. Os clones corretos pela digestão foram confirmados pelo sequenciamento de DNA. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto e a sequência de DNA foi designada pMIBa101.

[0566] O plasmídeo pHJJ76-no ura (supra) foi digerido com *NotI* seguido pelo tratamento com CIP. O fragmento de 5,2 kbp linear foi purificado usando um Kit de Purificação pela PCR QIAQUICK® (Qiagen).

[0567] O cassete de expressão YMR226c foi excisado de pMIBa101 pela digestão com *NotI*. Uma faixa de aproximadamente 3546 pares de base foi excisada do gel e purificada usando o Kit de Extração em Gel QIAQUICK® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

[0568] O fragmento de 3546 pares de base purificado de pMIBa101 foi ligado dentro do vetor pHJJ76-no ura de 5,2 kbp linearizado usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 10 µL composto de 1 µL do fragmento de 5,2 kbp de pHJJ76-no ura, 1 µL ou 5 µL do fragmento de 3546 pares de base de pMIBa101, 1 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada durante a noite a 16°C e uma alíquota de 4 µL da reação foi transformada em células da *E. coli* quimicamente competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram plaqueados em placas

2X YT+amp e incubadas a 37°C durante a noite. Vários dos transformantes resultantes foram triados quanto a inserção apropriada pela digestão de restrição usando *Xba*I e *Kpn*I. Um clone que produz o tamanho de faixa digerida correto foi designado pMIBa109.

[0569] A sequência de nucleotídeo do tipo selvagem que codifica a 3-HPDH de *S. cerevisiae* da SEQ ID NO: 129 foi removida do plasmídeo pMIBa109 pela digestão com *Xba*I e *Pac*I e purificada pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 818 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0570] O produto de gene de 3-HPDH da *S. cerevisiae* de aproximadamente 818 pares de base purificado foi ligado dentro do vetor pMBin204 de 8,4 kbp linearizado acima usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 20 µL composto de 1 µL do vetor de 8,4 kbp, 10 µL do inserto de 818 pares de base, 2 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 18 horas a 16°C e uma alíquota de 10 µL da reação foi transformada em células One Shot TOP10 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de um período de recuperação, duas alíquotas de 100 µL da reação de transformação foram plaqueadas em placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes putativos foram selecionados das placas de seleção e o DNA plasmídico foi preparado a partir de cada uma usando um BIOROBOT® 9600 (Qiagen). Os clones foram analisados pela digestão de restrição e um plasmídeo com o padrão de digestão de restrição correto foi designado pMcTs91.

Construção de plasmídeo para a integração de 3-HPDH de M.

sedula no local adh9091

[0571] Uma sequência de nucleotídeo de *I. orientalis* otimizada no códon da SEQ ID NO: 343 que codifica a 3-HPDH de *M. sedula* da SEQ ID NO: 29 foi sintetizado pela GeneArt® resultando no plasmídeo 11AAE2AP. O gene sintético foi digerido a partir do plasmídeo com XbaI e PacI e purificado pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 959 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0572] O produto de gene de 3-HPDH de *M. sedula* de aproximadamente 959 pares de base purificado foi ligado dentro do vetor pMBin204 de 8,4 kbp linearizado acima usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 20 µL composto de 1 µl do vetor de 8,4 kbp, 16 µl do inserto de 959 pares de base, 2 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 1 hora na temperatura ambiente e uma alíquota de 10 µL da reação foi transformada em células Super Competentes Solo Pack Gold (Agilent) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de um período de recuperação, duas alíquotas de 100 µl da reação de transformação foram plaqueadas em placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes putativos foram selecionados das placas de seleção e o DNA plasmídico foi preparado a partir de cada uma usando um BIOROBOT® 9600 (Qiagen). Os clones foram analisados pela digestão de restrição e um plasmídeo com o padrão de digestão de restrição correto foi designado pMcTs76.

Construção de plasmídeo para a integração da 3-HPDH de E. coli no local adh9091

[0573] Uma sequência de nucleotídeo de *I. orientalis*

otimizada no códon da SEQ ID NO: 143 que codifica a 3-HPDH da *E. coli* da SEQ ID NO: 27 foi sintetizada pela GeneArt® resultando no plasmídeo 1045168. O gene sintético foi digerido a partir do plasmídeo com XbaI e PacI e purificado pela eletroforese em gel de agarose em tampão TBE como aqui descrito. Uma faixa de aproximadamente 761 pares de base foi excisada do gel e purificada usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0574] O produto de gene de 3-HPDH da *E. coli* com aproximadamente 761 pares de base purificado foi ligado dentro do vetor pMBin204 de 8,4 kbp linearizado acima usando a T4 ligase (New England Biolabs) em um volume de reação total de 20 µL composto de 1 µL do vetor de 8,4 kbp, 16 µL do inserto de 761 pares de base, 2 µL de 10X tampão de ligação com 10 mM de ATP (New England Biolabs), e 1 µL de T4 ligase (New England Biolabs). A reação foi incubada por 1 hora na temperatura ambiente e uma alíquota de 10 µL da reação foi transformada em células Super Competentes Solo Pack Gold (Agilent) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de um período de recuperação, duas alíquotas de 100 µL da reação de transformação foram plaqueadas em placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes putativos foram selecionados das placas de seleção e o DNA plasmídico foi preparado a partir de cada uma usando um BIOROBOT® 9600 (Qiagen). Os clones foram analisados pela digestão de restrição e um plasmídeo com o padrão de digestão de restrição correto foi designado pMcTs77.

Integração de fragmentos de 3-HPDH em adh9091 em McTs259

[0575] Os plasmídeos pMcTs76, pMcTs77, pMcTs91 foram digeridos com KpnI e ApaI, e o plasmídeo pMcTs90 foi digerido com SacI e ApaI como aqui descrito. Os produtos de digestão resultantes foram

purificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, e o fragmento de 5,5 kbp de pMcTs76, o fragmento de 5,3 kbp de pMcTs77, o fragmento de 5,4 kbp de pMcTs90, e o fragmento de 5,4 kbp de pMcTs91 foram excisados do gel e purificados usando um Kit NUCLEOSPIN® Extract II (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

[0576] A cepa McTs259 que expressa quatro cópias de nucleotídeos que codificam a ADC de *B. licheniformis* da SEQ ID NO: 139 no local adh1202 e a deleção do gene de *I. orientalis* nativo que codifica a 3-HPDH da SEQ ID NO: 26 (*supra*), foi transformado com o DNA digerido pMcTs76, pMcTs77, pMcTs90, ou pMcTs91. Os locais corretos de alvejamento e transformação foram verificados pela PCR usando o kit pHire® Plant Direct PCR (Finnzymes) de acordo com as instruções do fabricante. Para confirmar as integrações no local adh9091, os pares de iniciador que seguem foram usados. Os iniciadores 0614627 e 0612909 produziram uma faixa de aproximadamente 3,47 kbp para o fragmento de pMcTs76 integrado, faixa de aproximadamente 3,27 kbp para o fragmento de pMcTs77 integrado, faixa de aproximadamente 3,34 kbp para o fragmento de pMcTs90 integrado, faixa de aproximadamente 3,33 kbp para o fragmento de pMcTs91 integrado; os iniciadores 0612908 e 0614626 produziram uma faixa de aproximadamente 1,97 kbp. Para checar as integrações em adh1202 os pares de iniciador que seguem foram usados. Os iniciadores 0611245 e 0612794 produziram uma faixa de aproximadamente 3,0 kbp e os iniciadores 0611815 e 0612795 produziram uma faixa de aproximadamente 3,6 kbp. Para checar a deleção do gene de *I. orientalis* nativo da 3-HPDH os iniciadores que seguem foram usados. Os iniciadores 0613034 e 0613241 produziram uma faixa de aproximadamente 1,4 kbp. Os isolados que deram as faixas esperadas para a integração apropriada do cassete de expressão no local adh9091, retiveram o cassete de expressão no local adh1202 e retiveram a deleção *I. orientalis* 3-HPDH foram salvos e designados McTs261 (fragmento pMcTs76), McTs263

(fragmento pMcTs77), McTs267 (fragmento pMcTs90), e McTs269 (fragmento pMcTs91) como mostrado na Tabela 29.

Tabela 29: Construções Transformantes

Plasmídeo de Construção	Gene	Fonte de Gene	SEQ ID NO do Produto de Gene	Construção de integração	Transformante
pMBin190	3-HPDH (YMR226c)	<i>I. orientalis</i>	26	pMcTs90	McTs267
11AAE2AP	3-HPDH (Msed_1993)	<i>M. sedula</i>	29	pMcTs76	McTs261
pMIBa109	3-HPDH (YMR226c)	<i>S. cerevisiae</i>	129	pMcTs91	McTs269
1045168	3-HPDH (<i>ydfG</i>)	<i>E. coli</i>	27	pMcTs77	McTs263

[0577] As cepas transformantes foram testadas quanto a produção de 3-HP usando o método do frasco agitado descrito acima. Os transformantes heterozigotos McTs267, McTs269, e McTs263 produziram 0,149 (+/- 0,024), 0,168 (+/- 0,052), e 0,162 (+/- 0,018) g/L de 3-HP por g/L de peso de célula seca, respectivamente. A cepa nativa MeJi412 produziu 0,263 (+/- 0,026) g/L de 3-HP por g/L de peso de célula seca, e a cepa de deleção de 3-HPDH não produziu nenhum 3-HP detectável. O transformante heterozigoto McTs261 não produz 3-HP detectável com este experimento. Estes resultados sugerem que mesmo os transformantes de 3-HPDH heterozigotos podem restaurar alguma atividade de 3-HPDH da cepa de deleção de 3-HPDH usando sequências exógenas ou endógenas do gene de 3-HPDH.

Exemplo 3B: Cepas de levedura modificadas que expressam genes do caminho de malato

[0578] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de PEP, OAA, e malato podem ser engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas no caminho. Os genes expressos podem incluir um ou mais de um gene de PPC, malato desidrogenase, e malato descarboxilase. Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira, ou eles podem ser

derivados de uma fonte de gene que não seja nativa para a célula hospedeira.

Exemplo 3C: Cepas de levedura modificadas que expressam genes do caminho de malonato semialdeído

[0579] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de PEP, OAA e malonato semialdeído podem ser engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas no caminho. Os genes expressos podem incluir um ou mais de um gene de PPC, 2-ceto ácido descarboxilase, KGD, BCKA, indolpiruvato descarboxilase, 3-HPDH (incluindo malonato semialdeído redutase), HIBADH, e 4-hidroxibutirato desidrogenase. Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira, ou eles podem ser derivados de uma fonte de gene que não seja nativa para a célula hospedeira.

Exemplo 3D: Cepas de levedura modificadas que expressam os genes do caminho da malonil-CoA

[0580] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de PEP, OAA, malonil-CoA, e, opcionalmente, malonato semialdeído podem ser engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas no caminho. Os genes expressos podem incluir um ou mais de um gene de PPC, OAA formiato liase, malonil-CoA redutase, malonato semialdeído desidrogenase que acila CoA, 3-HPDH (incluindo a malonato semialdeído redutase), HIBADH, e 4-hidroxibutirato desidrogenase. Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira, ou eles podem ser derivados de uma fonte de gene que não seja nativa para a célula hospedeira.

Exemplo 3E: Cepas de levedura modificadas que expressam genes do caminho da malonil-CoA

[0581] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de piruvato, acetil-CoA, malonil-CoA, e, opcionalmente, malonato semialdeído podem ser

engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas no caminho. Os genes expressos pode incluem um ou mais de um gene de PDH, acetil-CoA carboxilase, malonil-CoA redutase, malonato semialdeído desidrogenase que acila CoA, 3-HPDH (incluindo a malonato semialdeído redutase), HIBADH, e 4-hidroxibutirato desidrogenase. Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira, ou eles podem ser derivados de uma fonte de gene que não seja nativa para a célula hospedeira.

Exemplo 3F: Cepas de levedura modificadas que expressam genes do caminho da alanina

[0582] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de piruvato, alanina, β -alanina, e, opcionalmente, malonato semialdeído, β -alanil-CoA, acrilil-CoA, e 3-HP-CoA podem ser engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas no caminho. Os genes expressos podem incluir um ou mais de um gene de alanina desidrogenase, piruvato/alanina aminotransferase, alanina 2,3 aminomutase, CoA transferase, CoA sintetase, β -alanil-CoA amônia liase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-CoA hidrolase, 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, BAAT, 3-HPDH (incluindo a malonato semialdeído redutase), HIBADH, e o gene de 4-hidroxibutirato desidrogenase. Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira, ou eles podem ser derivados de uma fonte de gene que não seja nativa para a célula hospedeira.

Exemplo 3G: Cepas de levedura modificadas que expressam genes do caminho da lactato

[0583] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de piruvato, lactato, lactil-CoA, acrilil-CoA, e 3-HP-CoA podem ser engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas neste caminho. Os genes expressos podem incluir um ou mais de um gene de LDH, CoA transferase, CoA

sintetase, lactil-CoA desidratase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-CoA hidrolase, e 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase. Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira, ou eles podem ser derivados de uma fonte de gene que não seja nativa para a célula hospedeira.

Exemplo 3H: Cepas de levedura modificadas que expressam genes do caminho de glicerol

[0584] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de glicerol e 3-HPA podem ser engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas neste caminho. Os genes expressos podem incluir um ou mais de um gene de glicerol desidratase e aldeído desidrogenase. Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira, ou eles podem ser derivados de uma fonte de gene que não seja nativa para a célula hospedeira.

Exemplo 3I: Cepas de levedura modificadas que expressam genes do caminho da β -alanil CoA

[0585] As células de levedura que produzem 3-HP por intermédio de um caminho que utiliza intermediários de PEP ou piruvato, β -alanina, β -alanil-CoA, acrilil-CoA, 3-HP-CoA, e, opcionalmente OAA, aspartato, e alanina podem ser engendradas pela expressão de uma ou mais enzimas envolvidas neste caminho. Os genes expressos podem incluir um ou mais de um gene de PPC, PYC, AAT, ADC, CoA transferase, CoA sintetase, β -alanil-CoA amônia liase, 3-HP-CoA desidratase, 3-HP-CoA hidrolase, 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, alanina desidrogenase, piruvato/alanina aminotransferase, e AAM. Os genes expressos podem ser derivados de um gene que seja nativo para a célula hospedeira, ou eles podem ser derivados de uma fonte de gene que não seja nativa para a célula hospedeira.

[0586] Em alguns aspectos, as células de levedura ou seus métodos de uso podem ser descritos pelos parágrafos numerados que seguem:

[B1] Uma célula de levedura geneticamente modificada que

compreende um caminho de fermentação de 3-HP ativo, em que a célula compreende um ou mais genes exógenos do caminho de 3-HP selecionados de:

- um gene de PPC exógeno;
- um gene de PYC exógeno;
- um gene de AAT exógeno;
- um gene de ADC exógeno;
- um gene de BAAT ou gabT exógenos; e
- um gene de 3-HPDH exógeno.

[B2] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B1, que compreende um gene de AAT exógeno.

[B3] A célula de levedura geneticamente modificada dos parágrafos B1 ou B2, que compreende um gene de PYC exógeno.

[B4] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B3, que compreende um gene de ADC exógeno.

[B5] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B4, que compreende um gene de BAAT ou gabT exógenos.

[B6] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B5, que compreende um gene de 3-HPDH exógeno.

[B7] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B1, que compreende:

- um gene de PYC exógeno;
- um gene de AAT exógeno;
- um gene de ADC exógeno;
- um gene de BAAT ou gabT exógenos; e
- um gene de 3-HPDH exógeno.

[B8] A célula de levedura geneticamente modificada de

qualquer um dos parágrafos de B1 a B7, que compreende um gene de PPC exógeno.

[B9] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B7, em que o gene de PYC exógeno codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8.

[B10] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B9, em que o gene de PYC exógeno codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 2.

[B11] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B9, em que o gene de PYC exógeno codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 3.

[B12] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B9, em que o gene de PYC exógeno codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 4.

[B13] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B9, em que o gene de PYC exógeno codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5.

[B14] A célula de levedura geneticamente modificada do

parágrafo B9, em que o gene de PYC exógeno codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 6.

[B15] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B9, em que o gene de PYC exógeno codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 7.

[B16] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B9, em que o gene de PYC exógeno codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8.

[B17] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B16, em que o gene de PYC exógeno compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1.

[B18] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B17, em que o gene de AAT codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 14, 15, e 16.

[B19] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B18, em que o gene de AAT codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 14.

[B20] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B18, em que o gene de AAT codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 15.

[B21] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B18, em que o gene de AAT codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 16.

[B22] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B21, em que o gene de AAT compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 13.

[B23] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B22, em que o gene de ADC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 17, 18, 133, 135, 137, e 139.

[B24] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B23, em que o gene de ADC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 17.

[B25] A célula de levedura geneticamente modificada do

parágrafo B23, em que o gene de ADC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 18.

[B26] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B23, em que o gene de ADC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 133.

[B27] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B23, em que o gene de ADC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 135.

[B28] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B23, em que o gene de ADC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 137.

[B29] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B23, em que o gene de ADC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 139.

[B30] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B29, em que o gene de ADC compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeo selecionada das

SEQ ID NOs: 130, 131, 132, 134, 136, e 138.

[B31] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B30, em que o gene de ADC compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 130.

[B32] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B30, em que o gene de ADC compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 131.

[B33] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B30, em que o gene de ADC compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 132.

[B34] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B30, em que o gene de ADC compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 134.

[B35] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B30, em que o gene de ADC compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 136.

[B36] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B30, em que o gene de ADC compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 138.

[B37] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B36, em que o gene de BAAT ou gabT exógenos codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, e 24.

[B38] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B37, em que o gene de BAAT ou gabT exógenos codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 20.

[B39] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B37, em que o gene de BAAT ou gabT exógenos codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21.

[B40] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B37, em que o gene de BAAT ou gabT exógenos codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 22.

[B41] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B37, em que o gene de BAAT ou gabT exógenos codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 23.

[B42] A célula de levedura geneticamente modificada do

parágrafo B37, em que o gene de BAAT ou gabT exógenos codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 24.

[B43] A célula de levedura geneticamente modificada qualquer do parágrafos B1 a B42, em que o gene de BAAT ou gene de gabT compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeo selecionada das SEQ ID NOs: 19, 140, 141, e 142.

[B44] A célula de levedura geneticamente modificada qualquer do parágrafo B43, em que o gene de BAAT ou gene de gabT compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 19.

[B45] A célula de levedura geneticamente modificada qualquer do parágrafo B43, em que o gene de BAAT ou gene de gabT compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 140.

[B46] A célula de levedura geneticamente modificada qualquer do parágrafo B43, em que o gene de BAAT ou gene de gabT compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 141.

[B47] A célula de levedura geneticamente modificada

qualquer do parágrafo B43, em que o gene de BAAT ou gene de gabT compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 142.

[B48] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B47, em que o dito gene de BAAT exógeno ou exógenos gabT é um gene de BAAT que também é um gene de gabT.

[B49] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B48, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste da SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, e 129.

[B50] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 26.

[B51] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 27.

[B52] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência

de aminoácido da SEQ ID NO: 28.

[B53] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 29.

[B54] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 30.

[B55] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 31.

[B56] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 32.

[B57] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 33.

[B58] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 34.

[B59] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B49, em que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 129.

[B60] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B59, em que o gene de 3-HPDH compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeo selecionada das SEQ ID NOs: 25, 143, 144, e 343.

[B61] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B60, em que o gene de 3-HPDH compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 25.

[B62] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B60, em que o gene de 3-HPDH compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 143.

[B63] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B60, em que o gene de 3-HPDH compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 144.

[B64] A célula de levedura geneticamente modificada do

parágrafo B60, em que o gene de 3-HPDH compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 343.

[B65] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B64, em que o gene de 3-HPDH também é um gene de HIBADH.

[B66] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B65, em que o gene de 3-HPDH também é um gene de 4-hidroxibutirato desidrogenase.

[B67] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B66, em que o gene de PPC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 10, 11, e 12.

[B68] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B67, em que o gene de PPC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 10.

[B69] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B67, em que o gene de PPC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 11.

[B70] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B67, em que o gene de PPC codifica um polipeptídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 12.

[B71] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B70, em que o gene de PPC compreende uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 9.

[B72] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B71, em que a dita célula de levedura é negativa em Crabtree.

[B73] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B72, em que a célula de levedura pertence a um gênero selecionado de *Issatchenkia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, e *Saccharomyces*.

[B74] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B73, em que a célula de levedura pertence a um clado selecionado do clado de *I. orientalis*/*P. fermentans* e do clado de *Saccharomyces*.

[B75] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B73, em que a célula de levedura é selecionada de *I. orientalis*, *C. lambica*, e *S. bulderi*.

[B76] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B75, em que a dita célula compreende ainda uma ou mais deleções ou interrupções de um gene nativo selecionado dos genes de PDC, ADH, GAL6, CYB2A, CYB2B, GPD, GPP, ALD, e PCK.

[B77] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B76, em que uma ou mais das deleções ou interrupções resulta da inserção de um ou mais dos genes exógenos do caminho de 3-HP.

[B78] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B77, em que um ou mais dos genes exógenos do caminho de 3-HP são operativamente ligados a um ou mais elementos reguladores exógenos.

[B79] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B78, em que o um ou mais elementos reguladores são estranhos para o um ou mais genes do caminho de 3-HP.

[B80] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B79, em que o gene de PYC exógeno é operativamente ligado a um promotor exógeno que é estranho ao gene de PYC.

[B81] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B80, em que o gene de AAT exógeno é operativamente ligado a um promotor exógeno que é estranho ao gene de AAT.

[B82] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B81, em que o gene de ADC exógeno é operativamente ligado a um promotor exógeno que é estranho ao gene de ADC.

[B83] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B82, em que o gene de BAAT ou gabT exógenos é operativamente ligado a um promotor exógeno que é estranho ao gene de BAAT ou gabT.

[B84] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B83, em que o gene de 3-HPDH exógeno é operativamente ligado a um promotor exógeno que é estranho ao gene de 3-HPDH.

[B85] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B84, em que o gene de PPC exógeno é operativamente ligado a um promotor exógeno que é estranho ao gene de PPC.

[B86] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B85, em que a célula é capaz de crescer em um pH de menos do que 4 em média contendo 75 g/L ou mais de 3-HP.

[B87] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B86, em que a célula é uma célula de levedura resistente a 3-HP.

[B88] A célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B87, em que a célula sofreu mutação e/ou seleção, tal que a célula mutada e/ou selecionada possui um grau mais alto de resistência a 3-HP do que uma célula do tipo selvagem da mesma espécie.

[B89] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B88, em que a célula sofreu mutação e/ou seleção antes de ser geneticamente modificada com o um ou mais genes exógenos do caminho de 3-HP.

[B90] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B88 ou B89, em que a célula sofreu seleção na presença de ácido láctico ou 3-HP.

[B91] A célula de levedura geneticamente modificada do parágrafo B91, em que a seleção é seleção de quimiostato.

[B92] Um método de produzir 3-HP que compreende:

(i) cultivar a célula de levedura geneticamente modificada de qualquer um dos parágrafos de B1 a B91 na presença de meio que compreende pelo menos uma fonte de carbono; e

(ii) isolar 3-HP da cultura.

[B93] O método do parágrafo B92, em que a dita fonte de carbono é selecionada de glicose, xilose, arabinose, sacarose, frutose, celulose, oligômeros de glicose, e glicerol.

[B94] O método do parágrafo B92 ou B93, em que o meio está em um pH de menos do que 5, por exemplo, na faixa de cerca de 1,5 a

cerca de 4,5, de cerca de 2,0 a cerca de 4,0, ou de cerca de 2,0 a cerca de 3,5.

REIVINDICAÇÕES

1. Célula de levedura geneticamente modificada caracterizada pelo fato de que é selecionada de *Issatchenkia orientalis*, *Candida lambica* e *Saccharomyces bulderi*, compreendendo uma via de fermentação 3-HP ativa, em que a célula compreende uma β -alanina aminotransferase exógena (gene BAAT) ou 4-aminobutirato aminotransferase (gene gabT), exógena significando que o gene não está presente na localização do gene no genoma de uma forma nativa da célula de levedura, em que o gene BAAT ou gene gabT codifica um polipeptídeo com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 ou SEQ ID NO: 21.

2. Célula de levedura geneticamente modificada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais genes exógenos da via de 3-HP selecionados de:

- um gene de PPC exógeno;
- um gene de piruvato carboxilase (PYC) exógeno;
- um gene de aspartato aminotransferase (AAT) exógeno;
- um gene de aspartato 1-descarboxilase (ADC) exógeno; e
- um gene de ácido 3-hidroxi propiônico desidrogenase (3-HPDH) exógeno.

3. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o gene de PYC codifica um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8.

4. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 ou 3, caracterizada pelo fato de que o gene de AAT codifica um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 14, 15, e 16.

5. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 4, caracterizada pelo fato de que

o gene de ADC codifica um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 17, 18, 133, 135, 137, e 139.

6. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 5, caracterizada pelo fato de que o gene de BAAT ou gene de gabT codifica um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 20 ou 21.

7. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 6, caracterizada pelo fato de que o gene de 3-HPDH codifica um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, e 129.

8. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 7, caracterizada pelo fato de que o gene de PPC codifica um polipeptídeo com uma sequência de aminoácido selecionada das SEQ ID NOs: 10, 11, e 12.

9. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a dita célula compreende, adicionalmente, uma ou mais deleções ou interrupções de um gene nativo selecionado dos genes de PDC, ADH, GAL6, CYB2A, CYB2B, GPD, GPP, ALD, e PCK.

10. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que uma ou mais das deleções ou interrupções resulta da inserção de um ou mais dos genes exógenos da via de 3-HP.

11. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizada pelo fato de que um ou mais dos genes exógenos da via de 3-HP são operativamente ligados a um ou mais elementos reguladores exógenos.

12. Célula de levedura geneticamente modificada, de acordo

com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizada pelo fato de que a célula é capaz de crescer em um pH de 3,9 em uma placa de meio YPD contendo 75 g/L, 100 g/L, 112,5 g/L ou 125 g/L de 3-HP, em que uma pasta com uma densidade óptica (OD) 600 de 4 é usada para inocular cada poço da placa a uma OD600 de 0,05 e as placas são subsequentemente cobertas com uma membrana permeável a gás e incubadas em um agitador a 30°C/300 RPM durante a noite antes de ser observado visualmente para o crescimento.

13. Método para produzir 3-HP, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) cultivar a célula de levedura geneticamente modificada, como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, na presença de meio que compreende pelo menos uma fonte de carbono; e

(ii) isolar 3-HP da cultura.

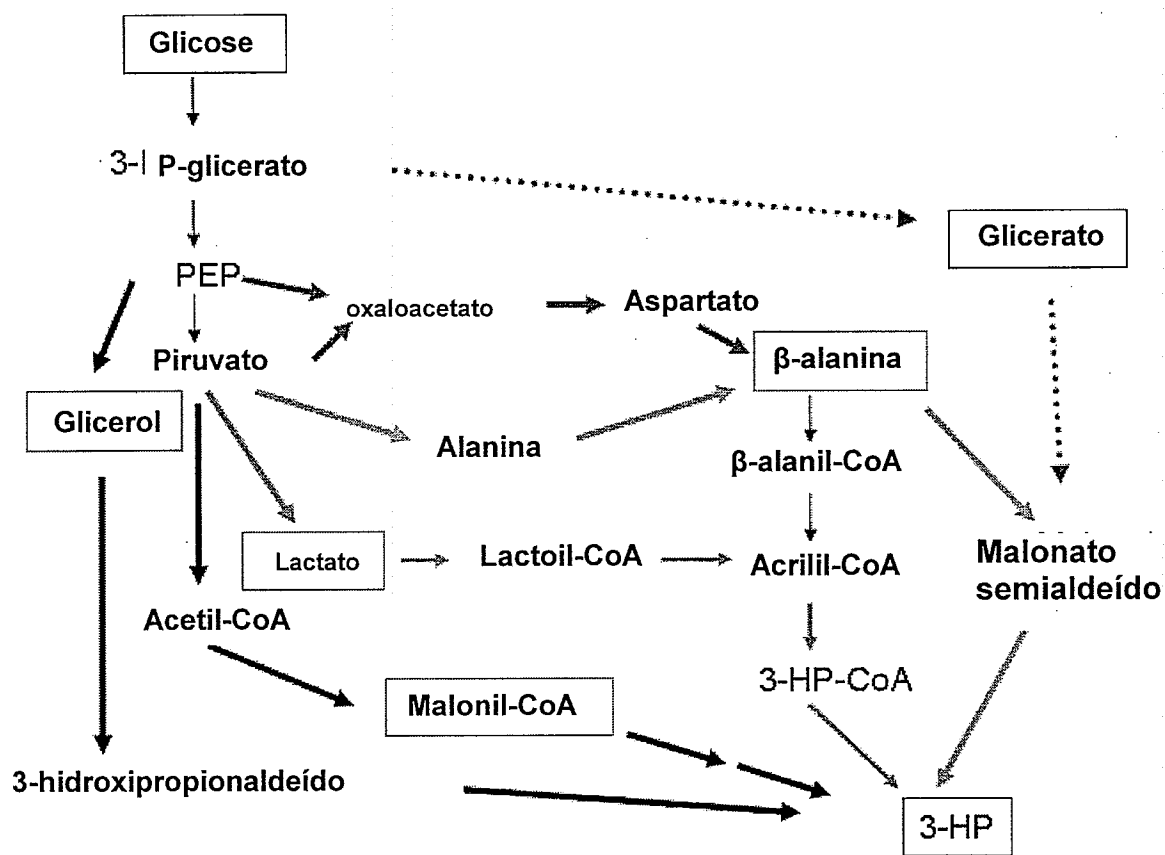


Fig. 1

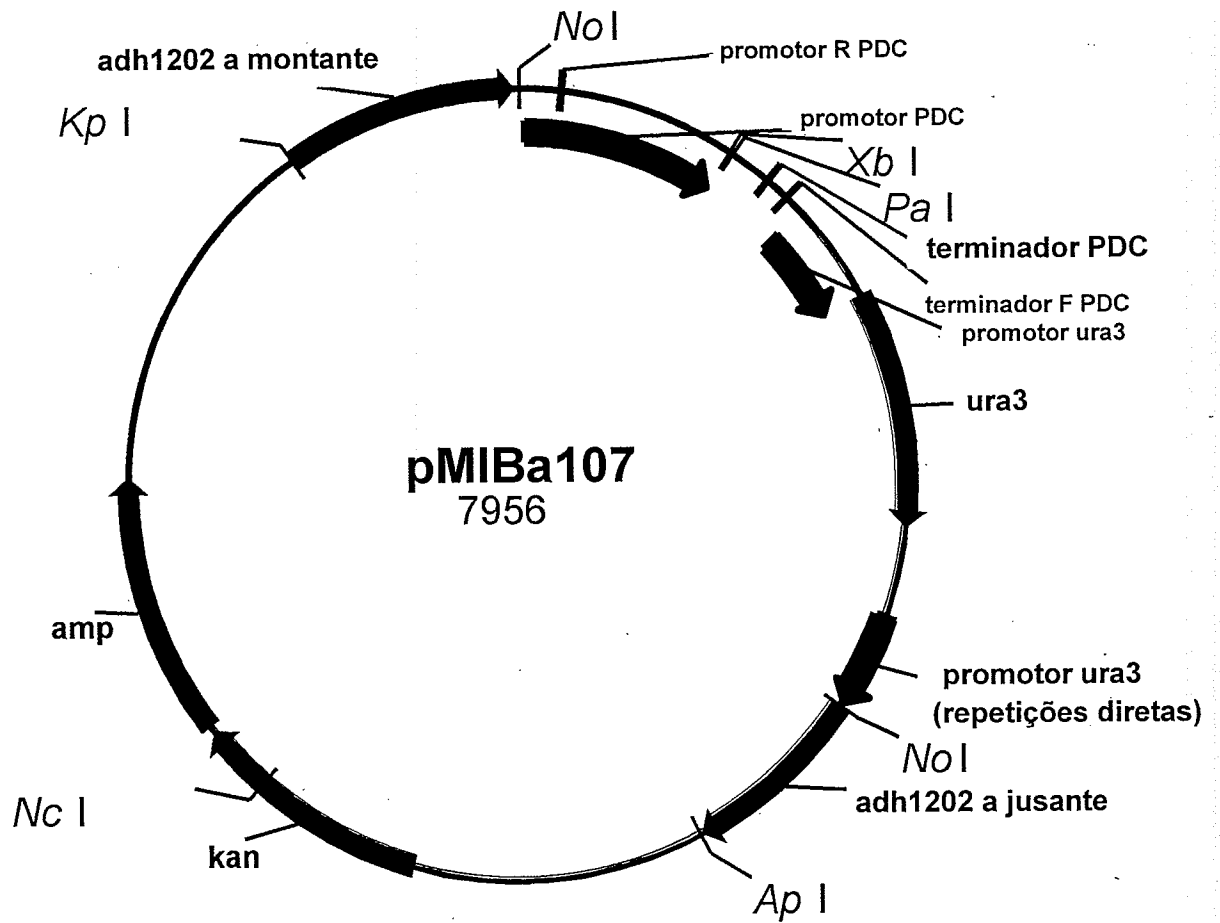


Fig. 2

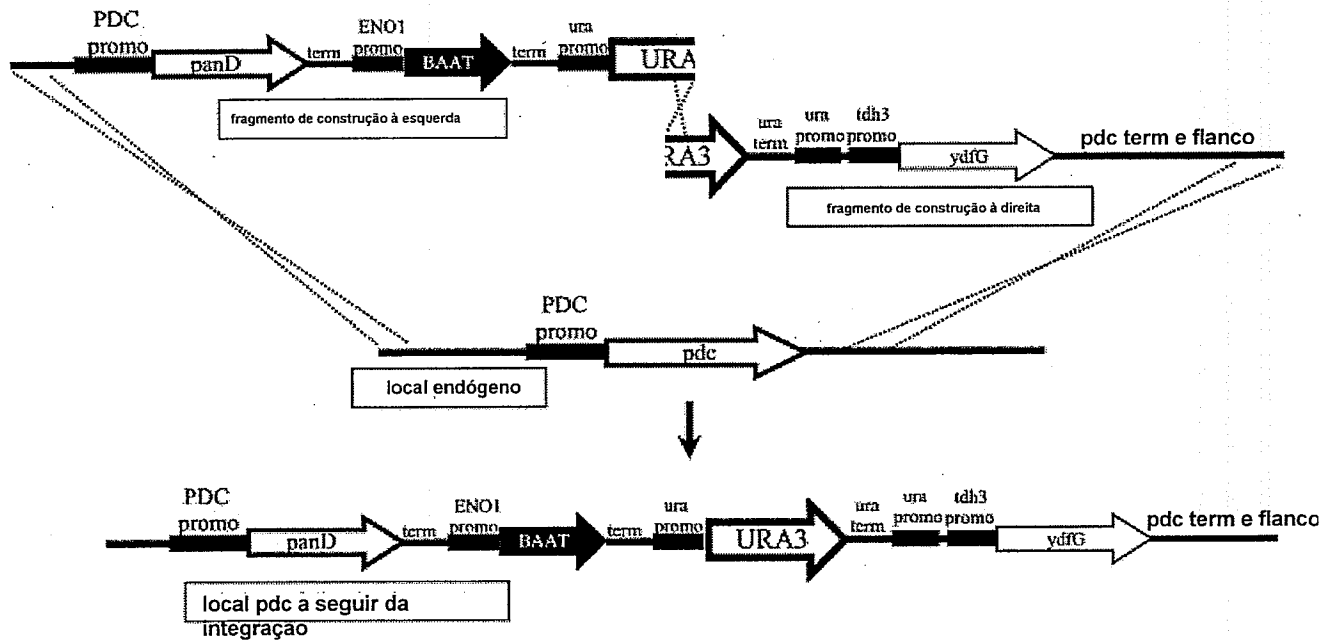


Fig. 3

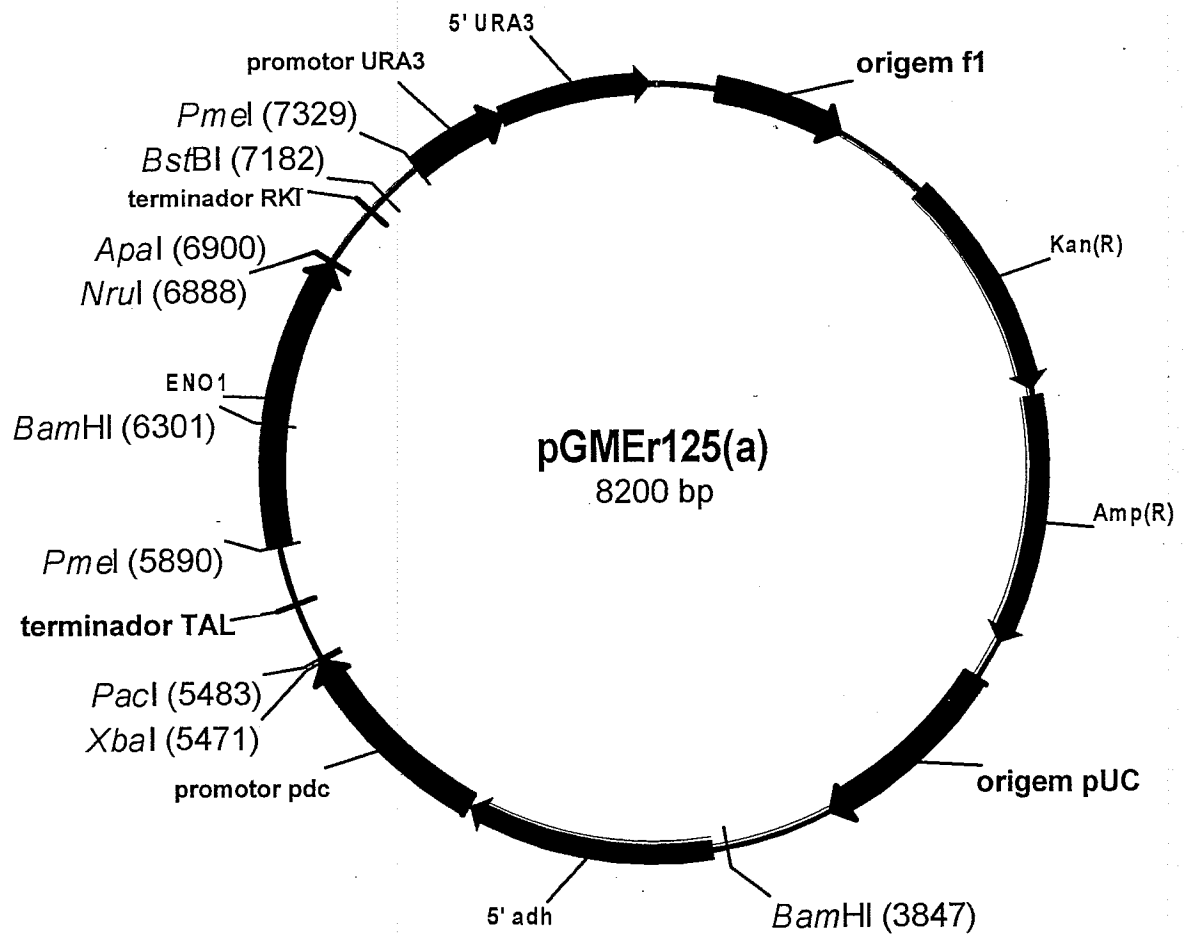


Fig. 4

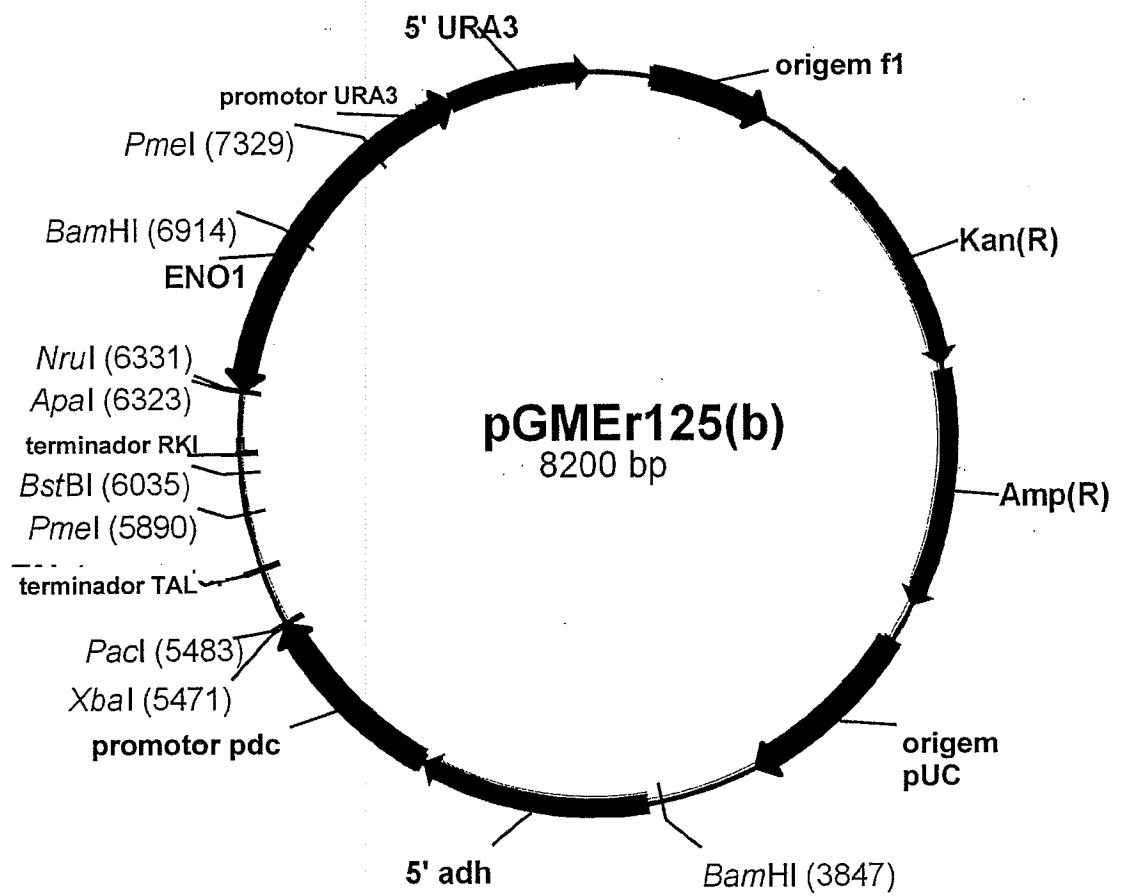


Fig. 5

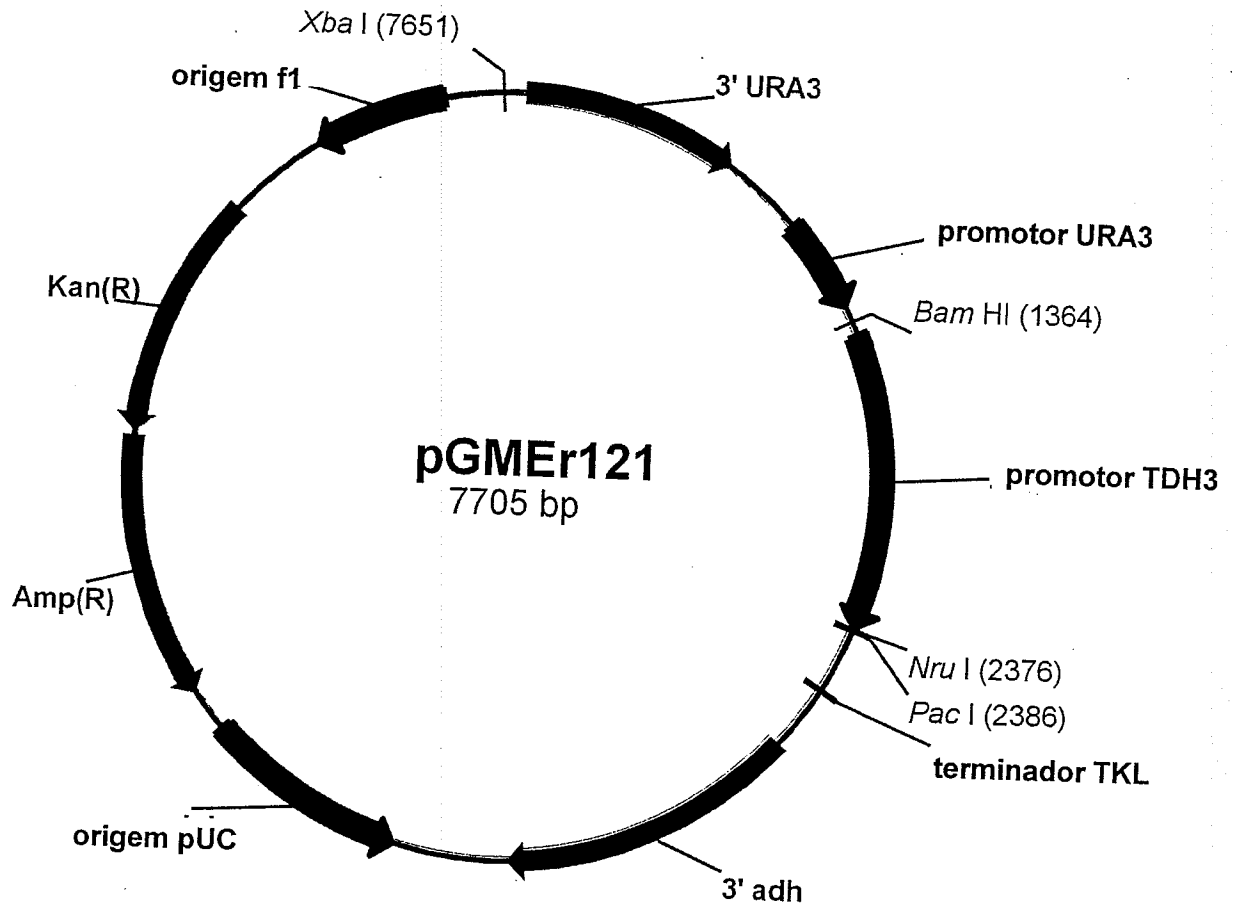


Fig. 6

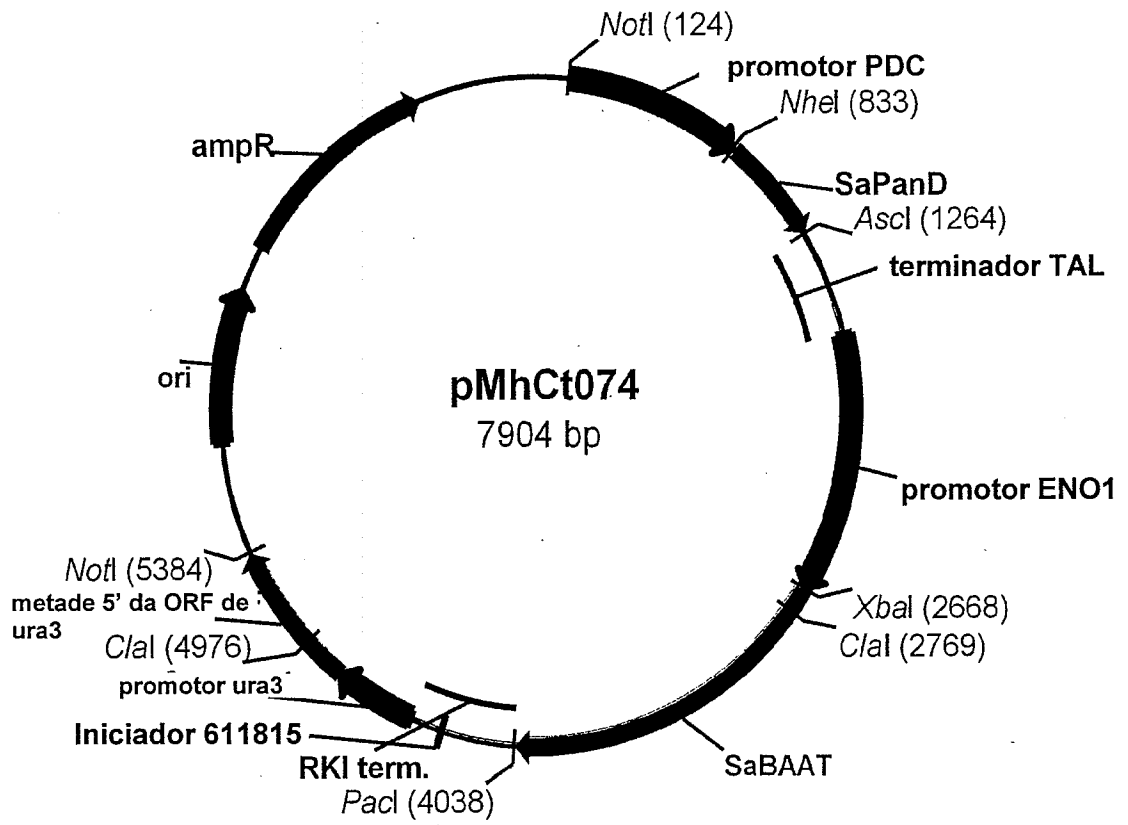


Fig. 7

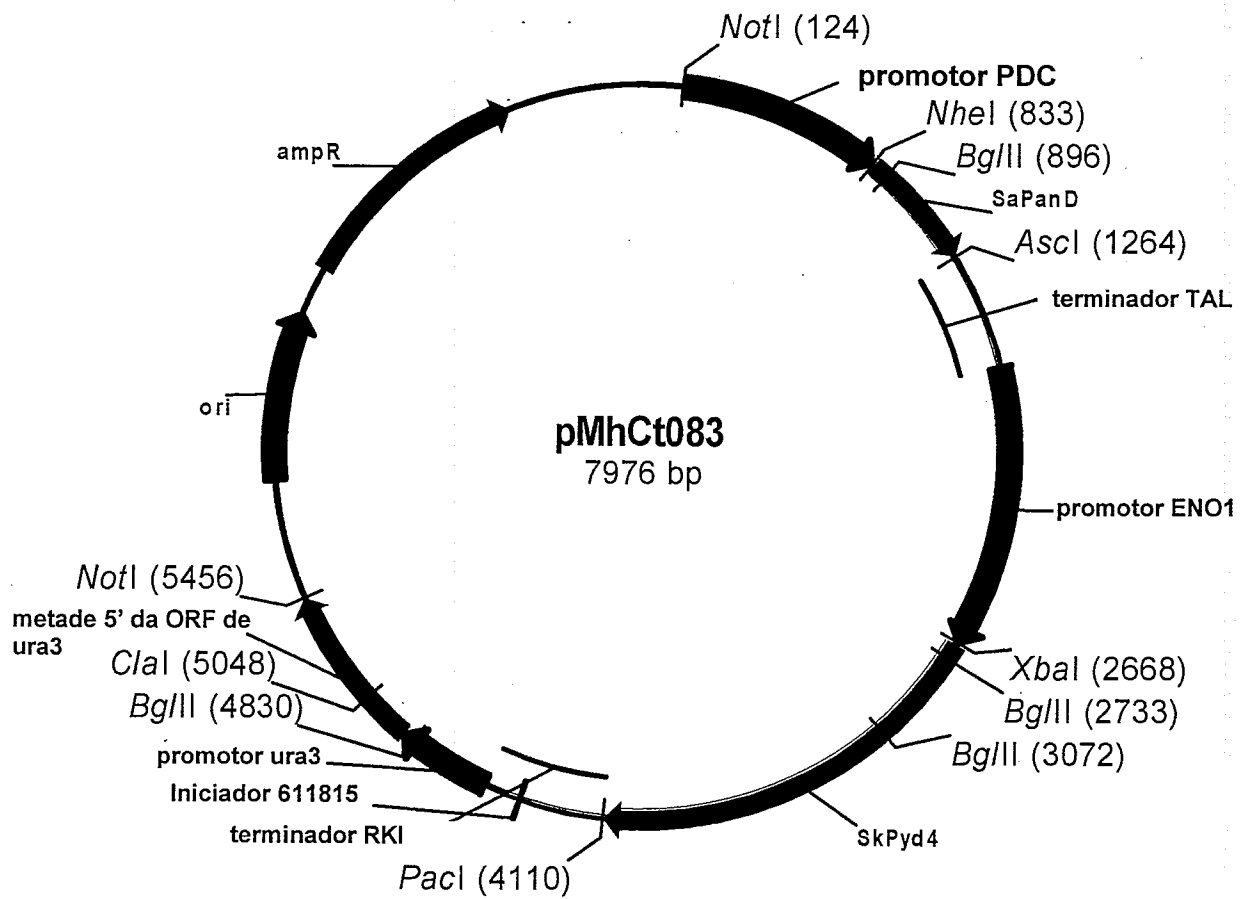


Fig. 8

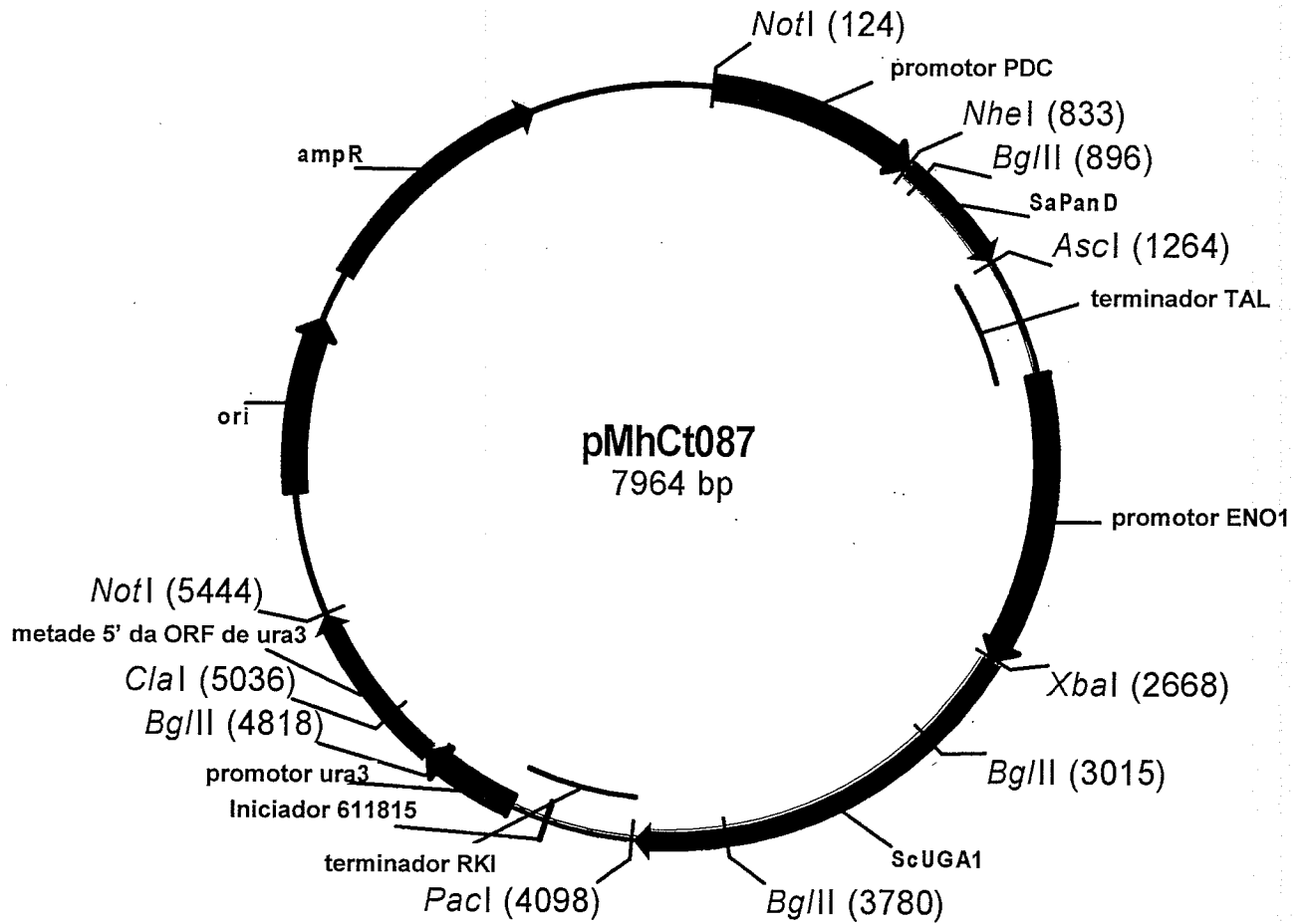


Fig. 9

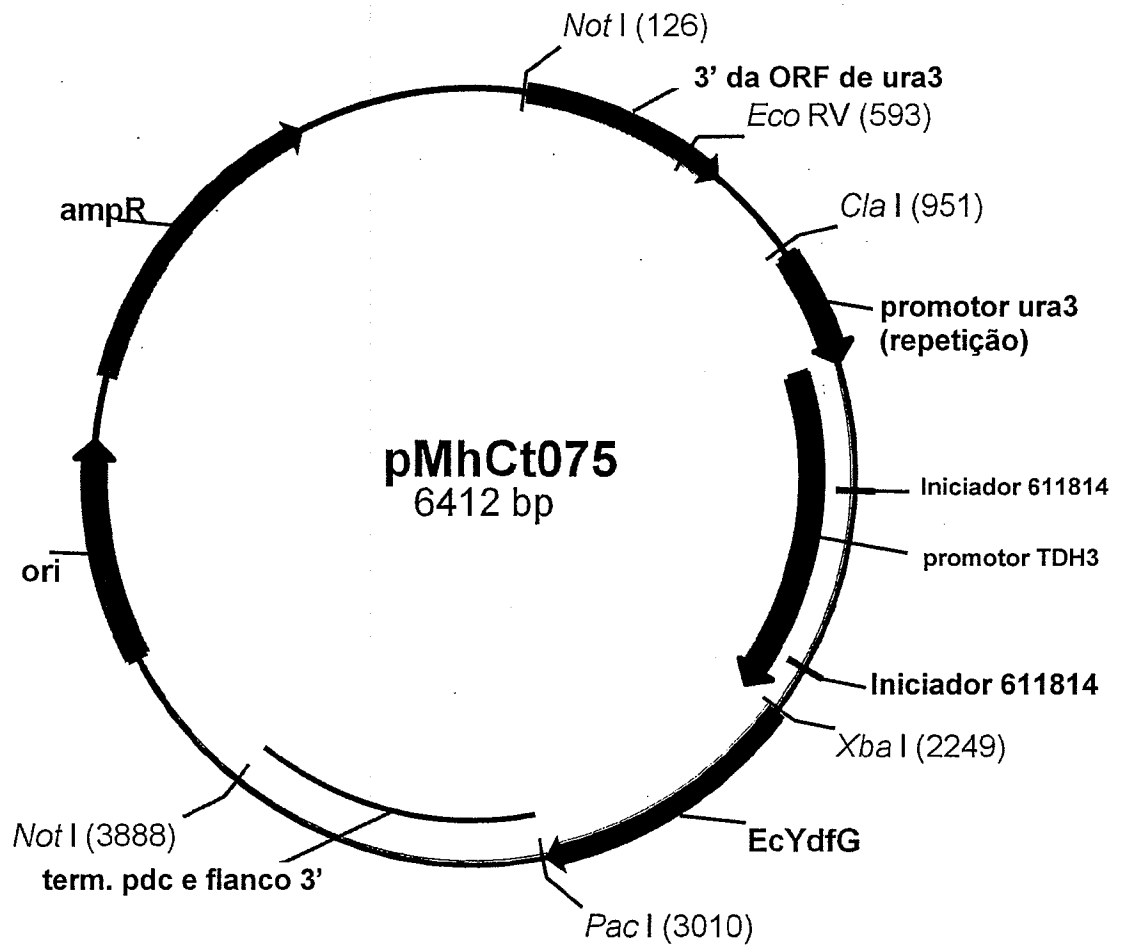


Fig. 10

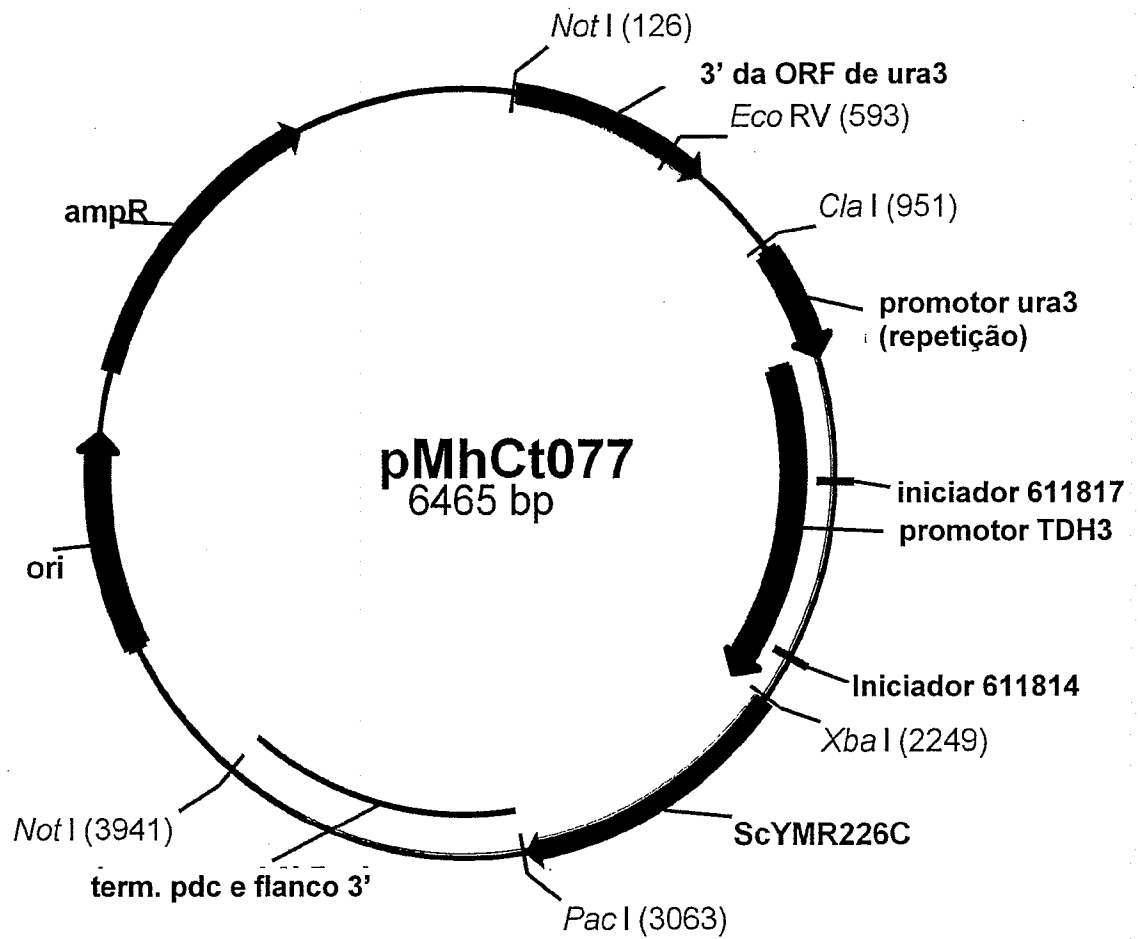


Fig. 11

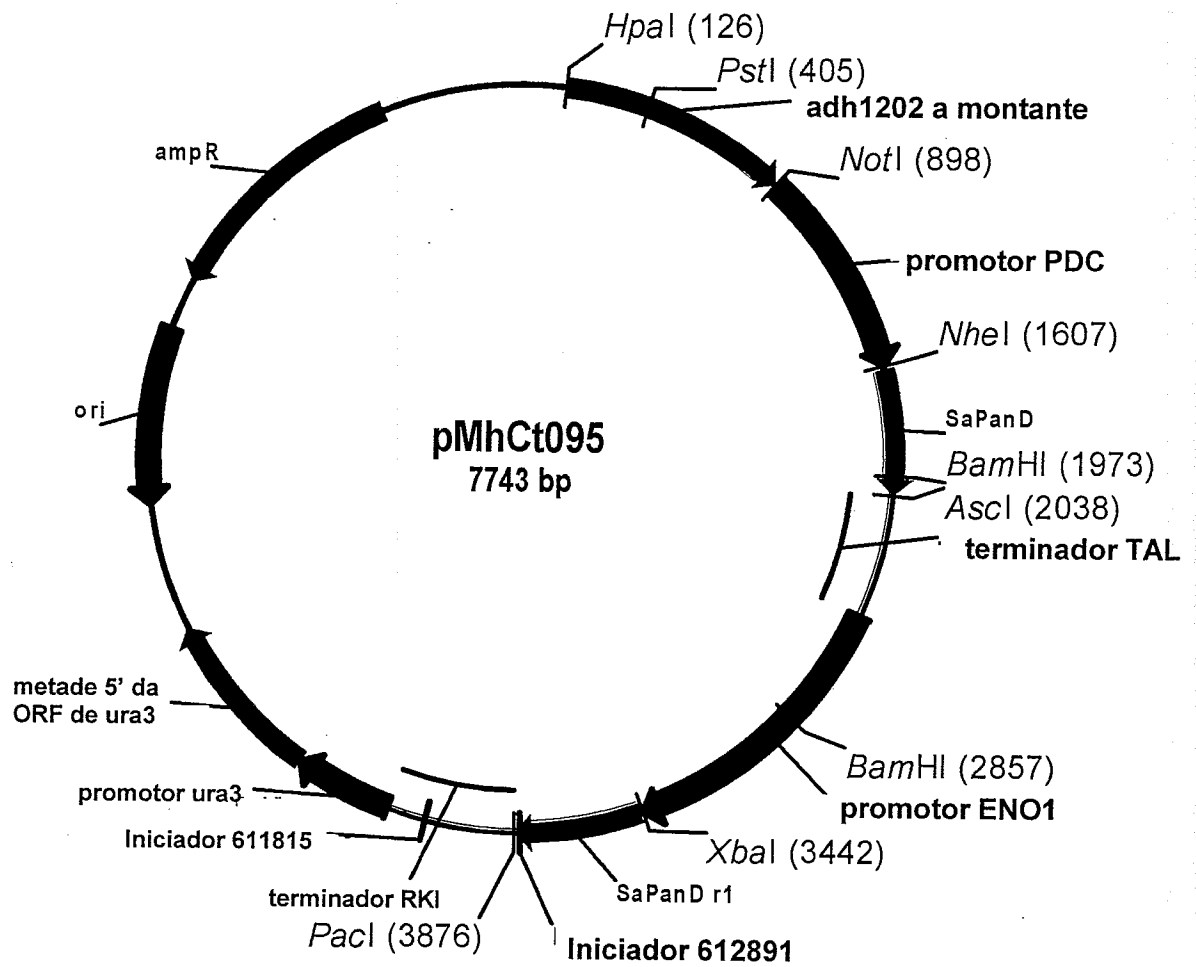


Fig. 12

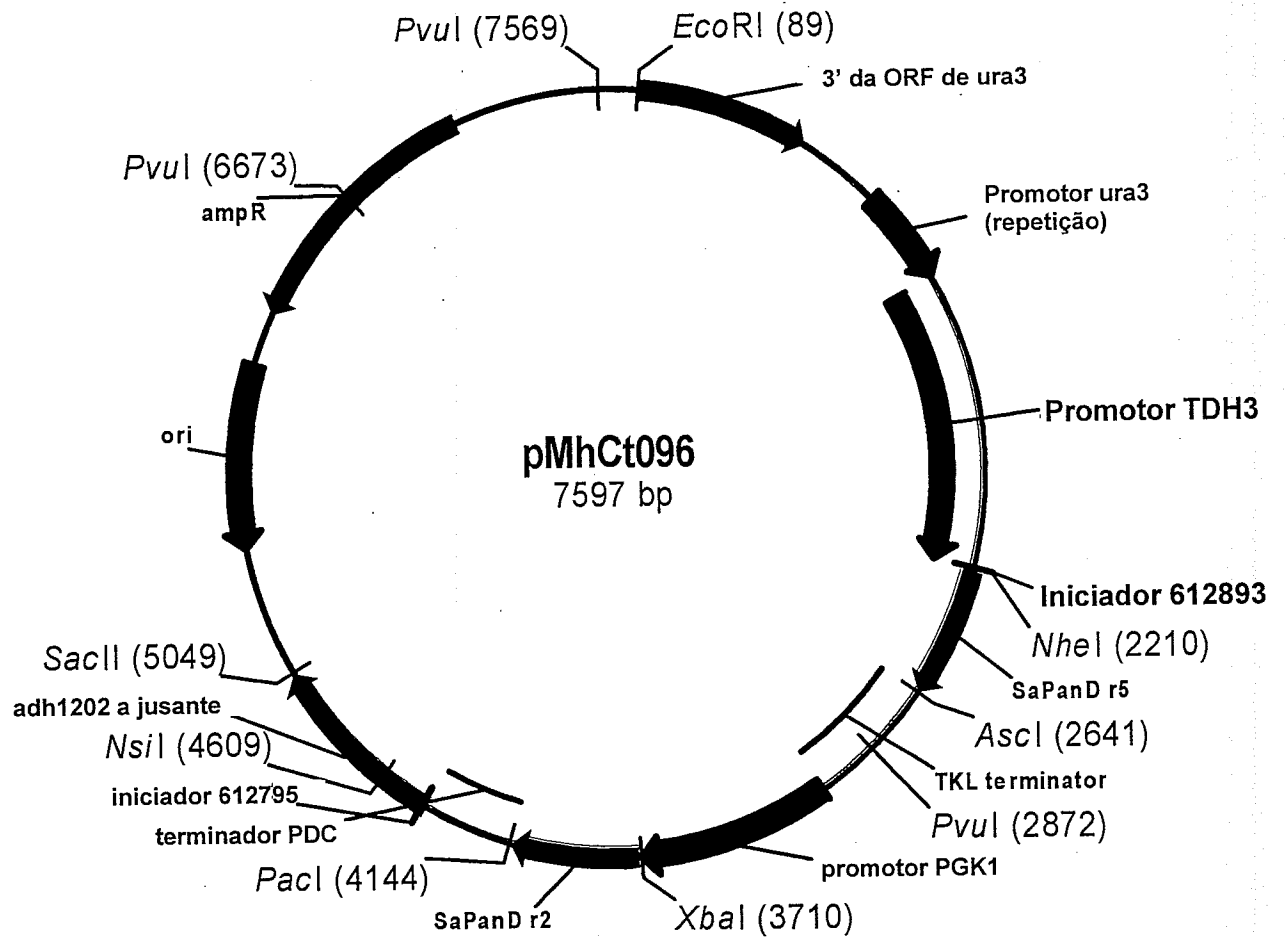


Fig. 13

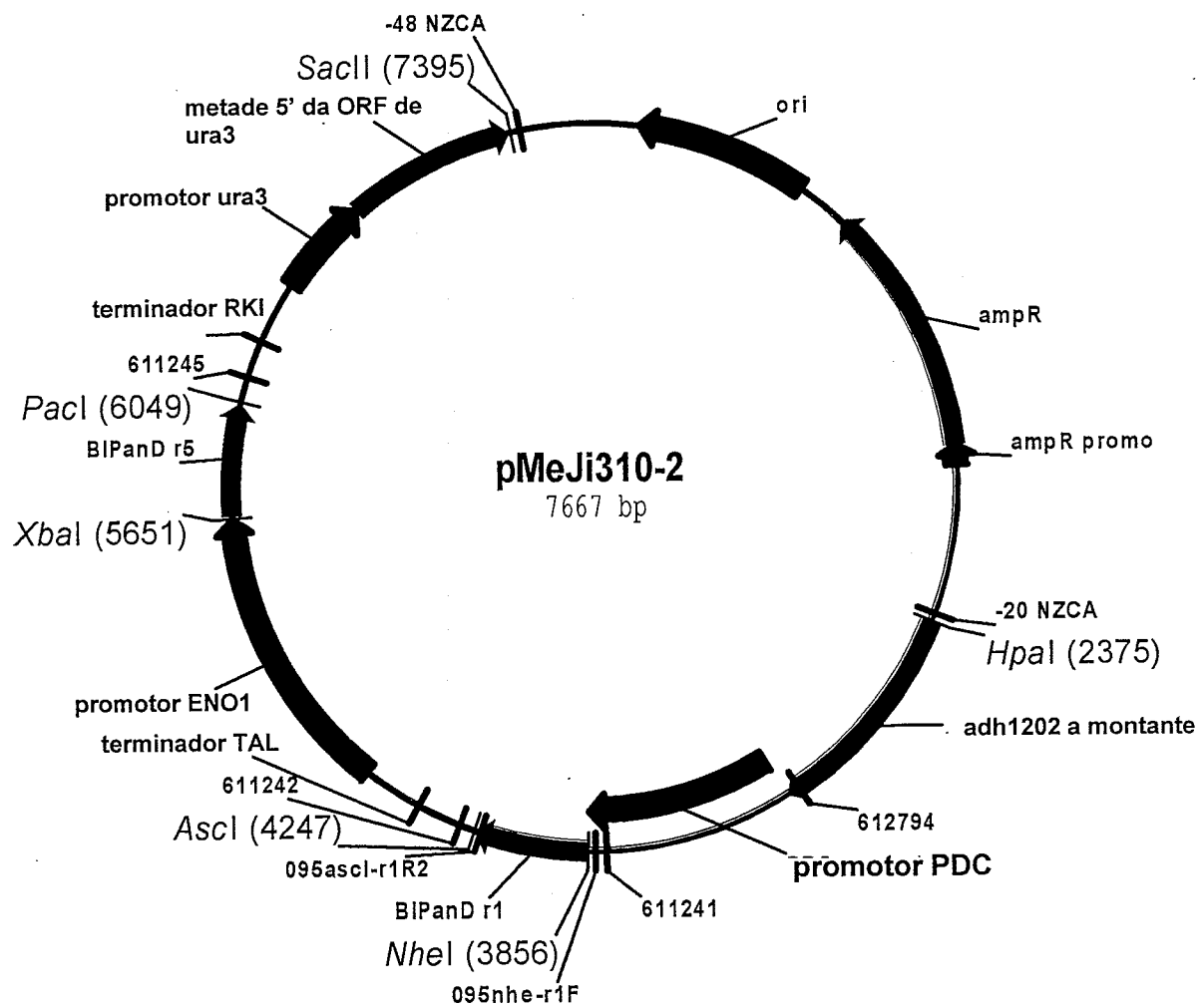


Fig. 14

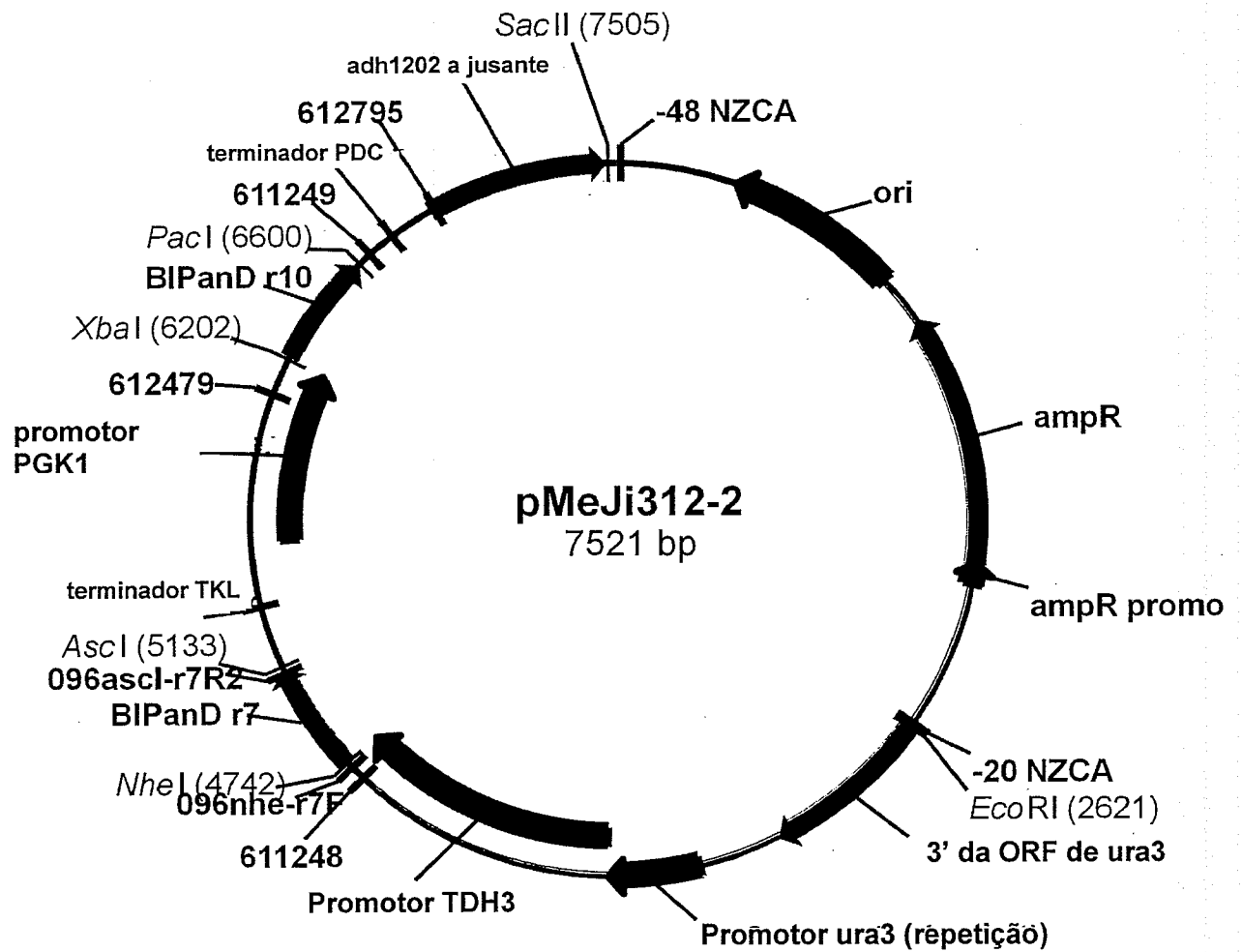


Fig. 15

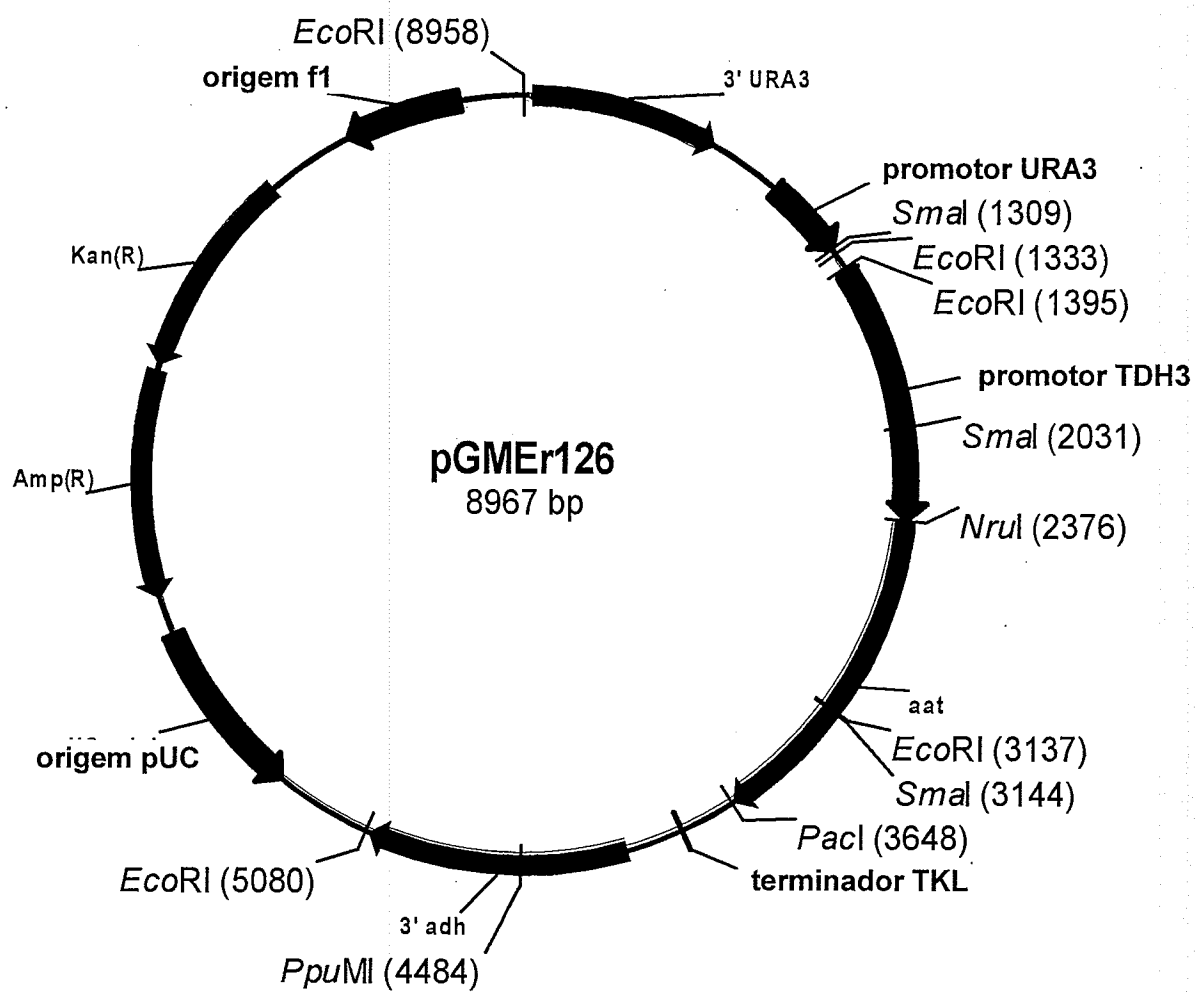


Fig. 16

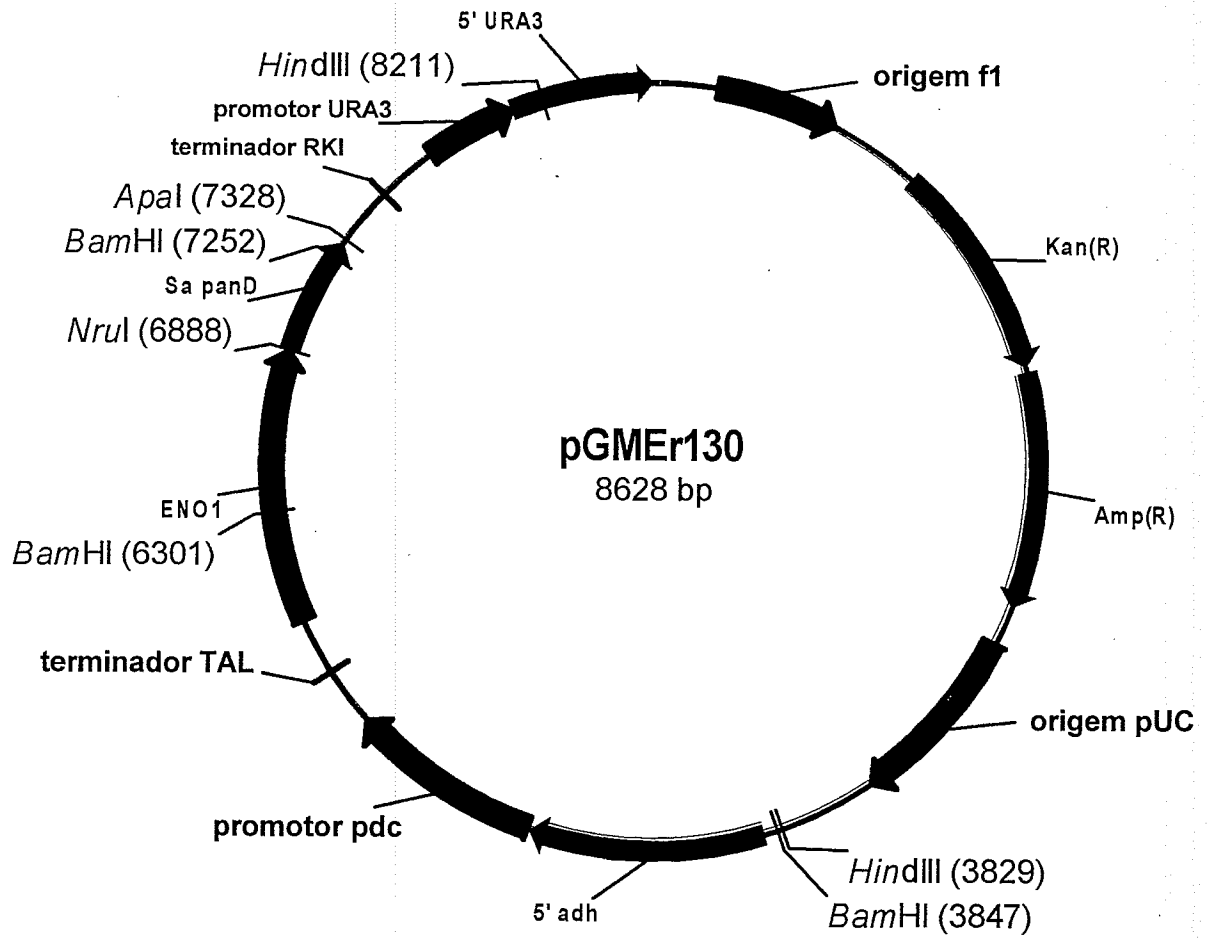


Fig. 17

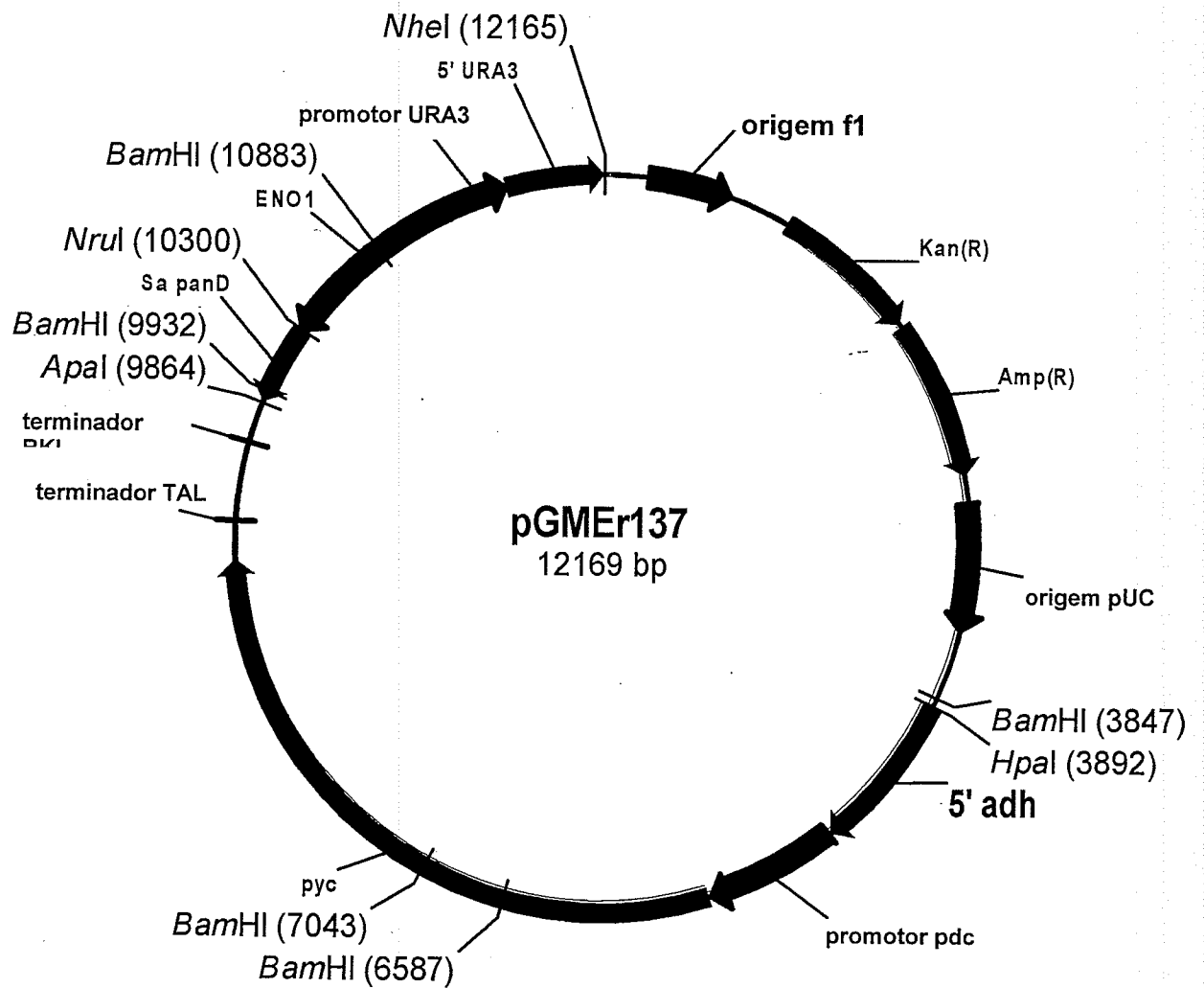


Fig. 18

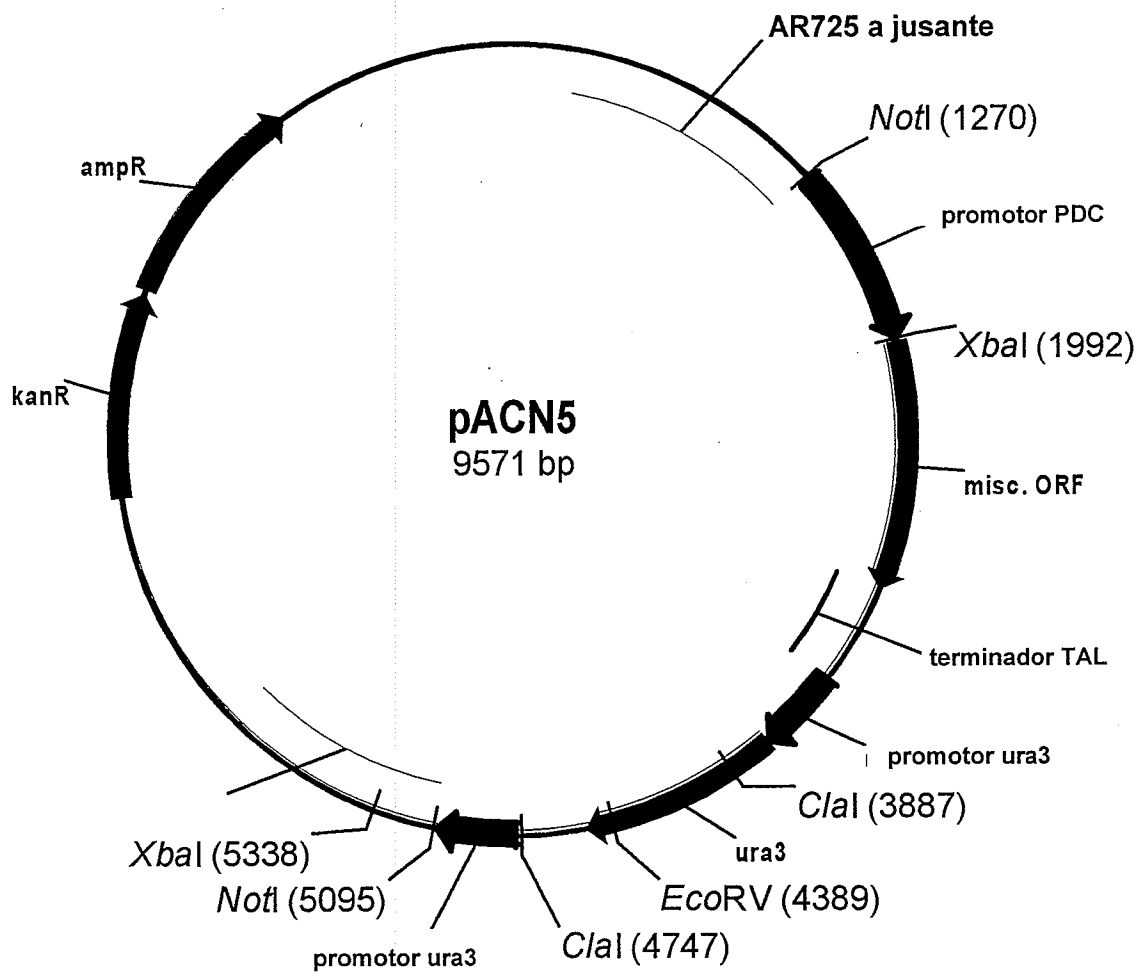


Fig. 19

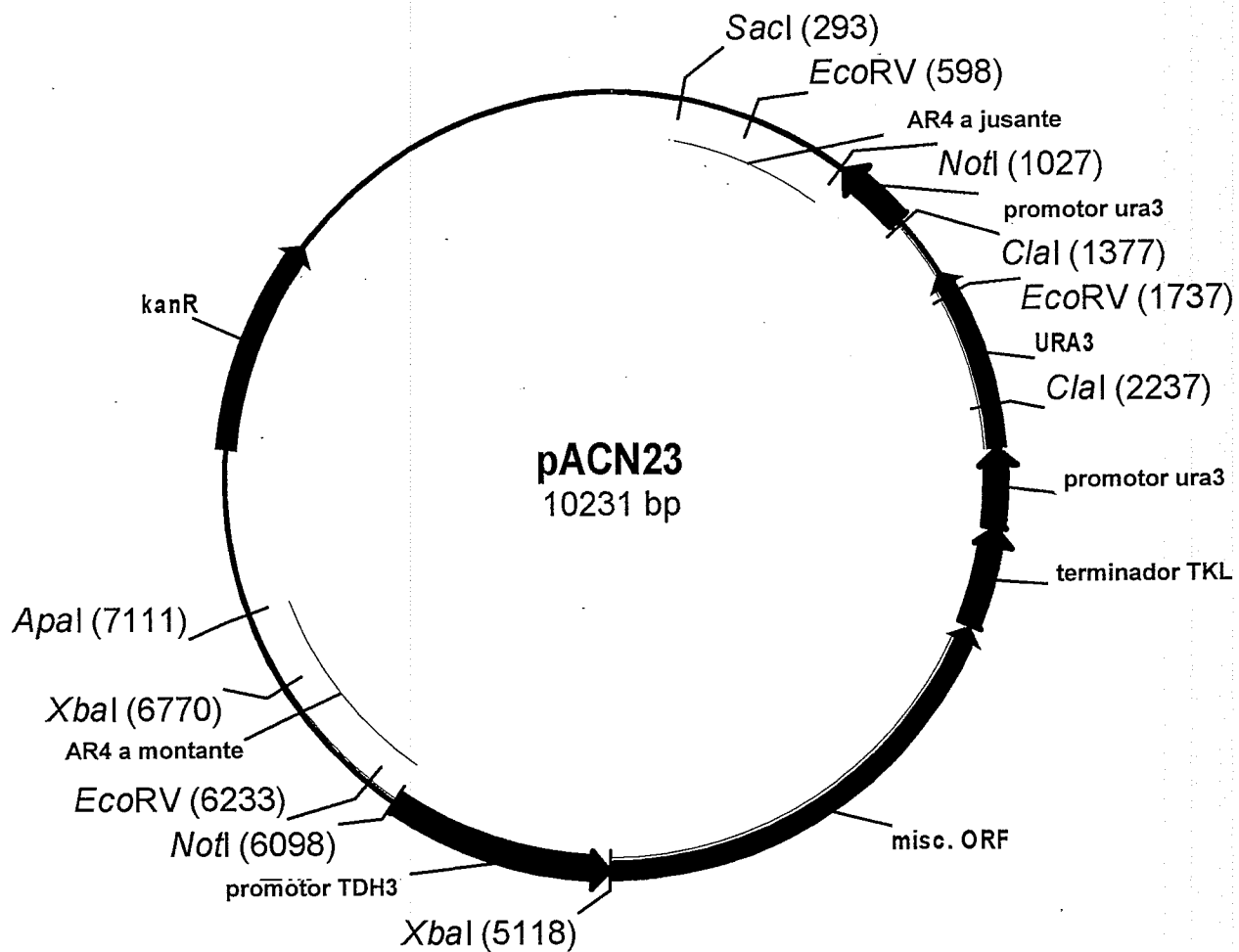


Fig. 20

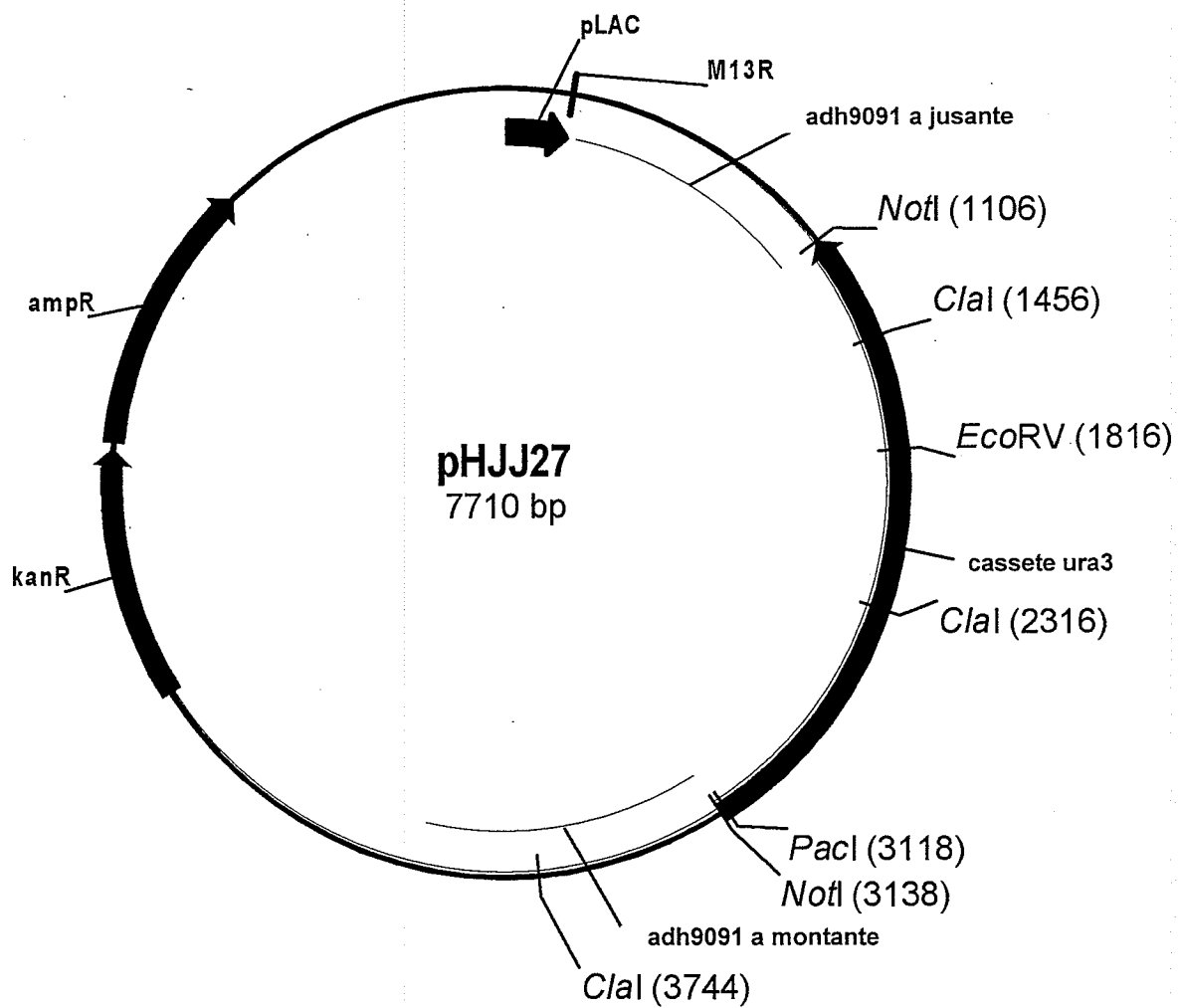


Fig. 21

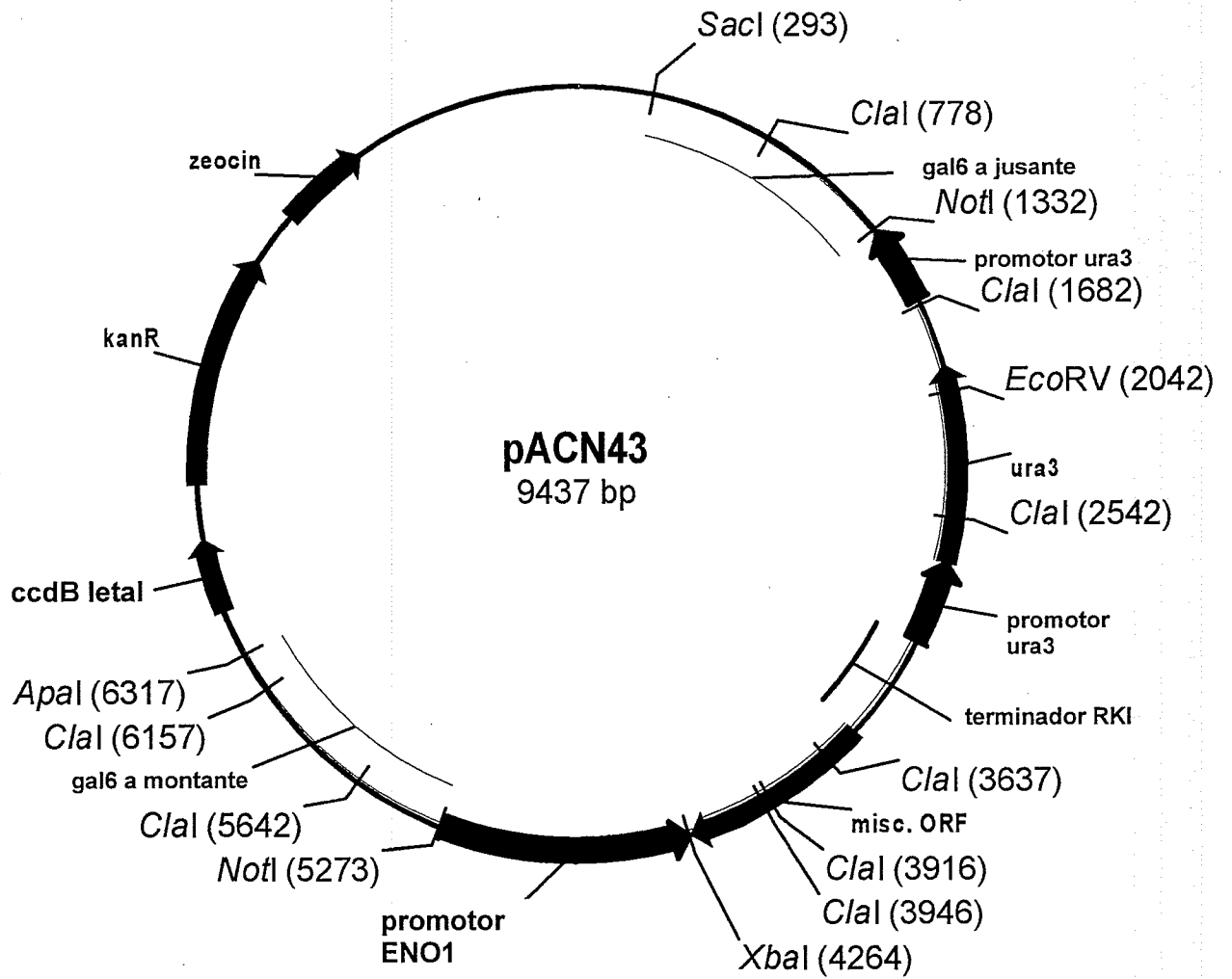


Fig. 22

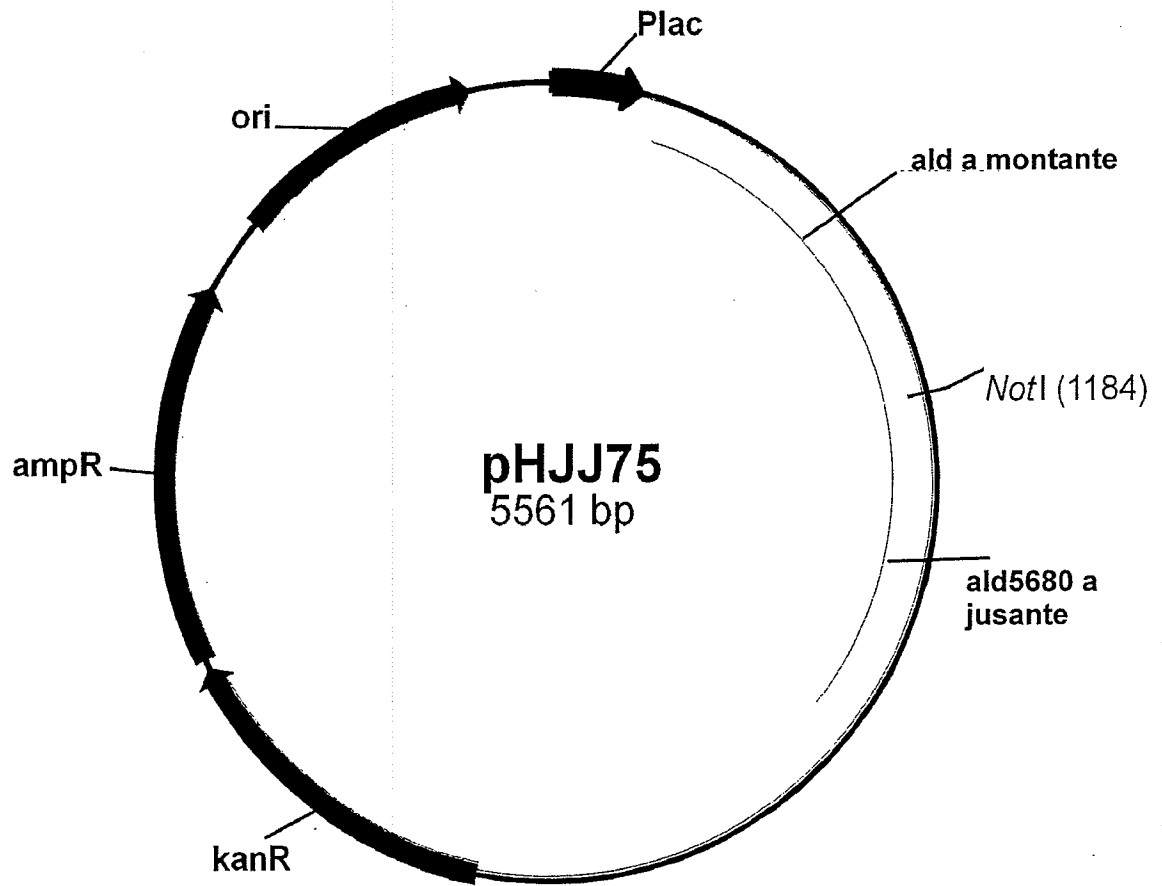


Fig. 23

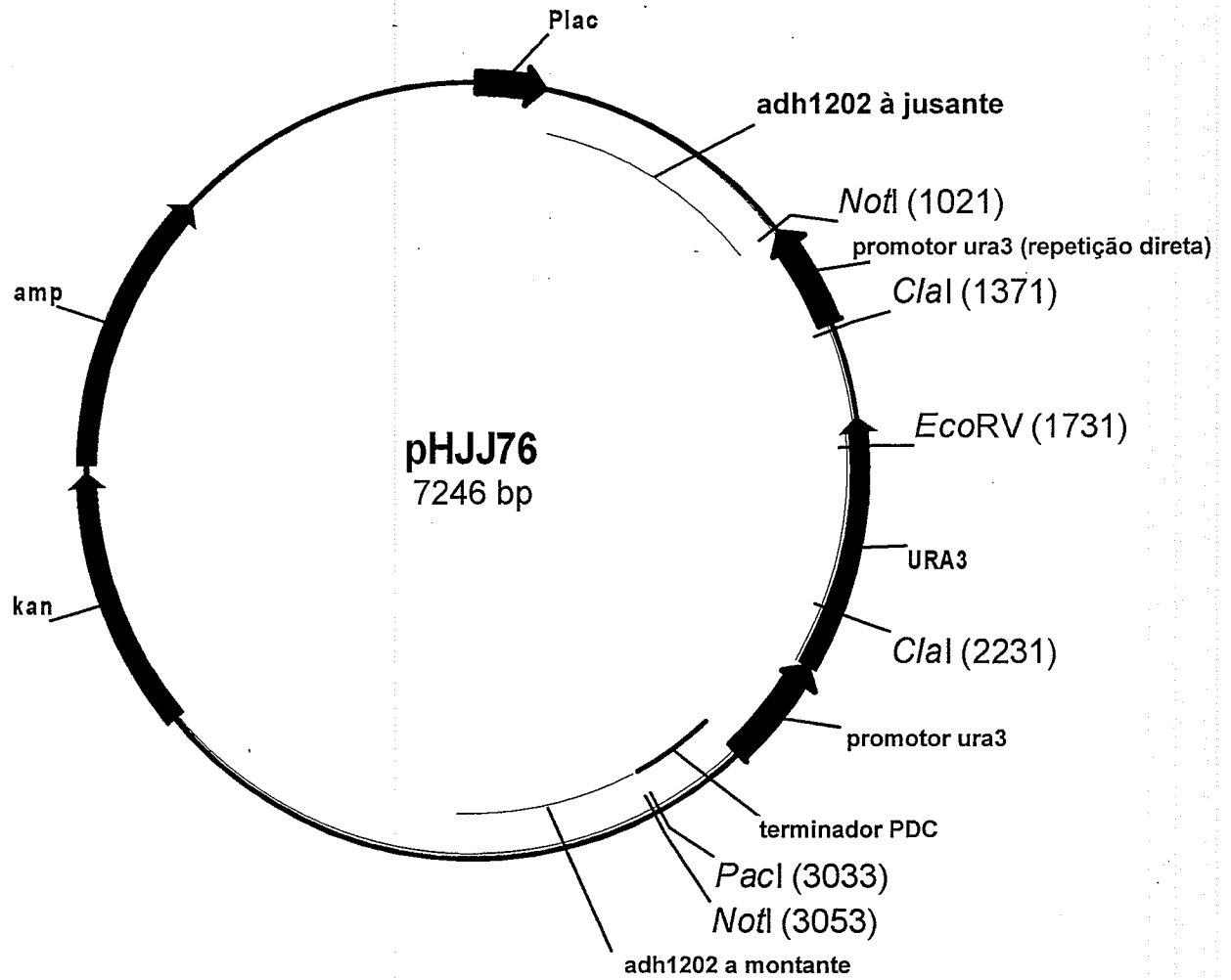


Fig. 24

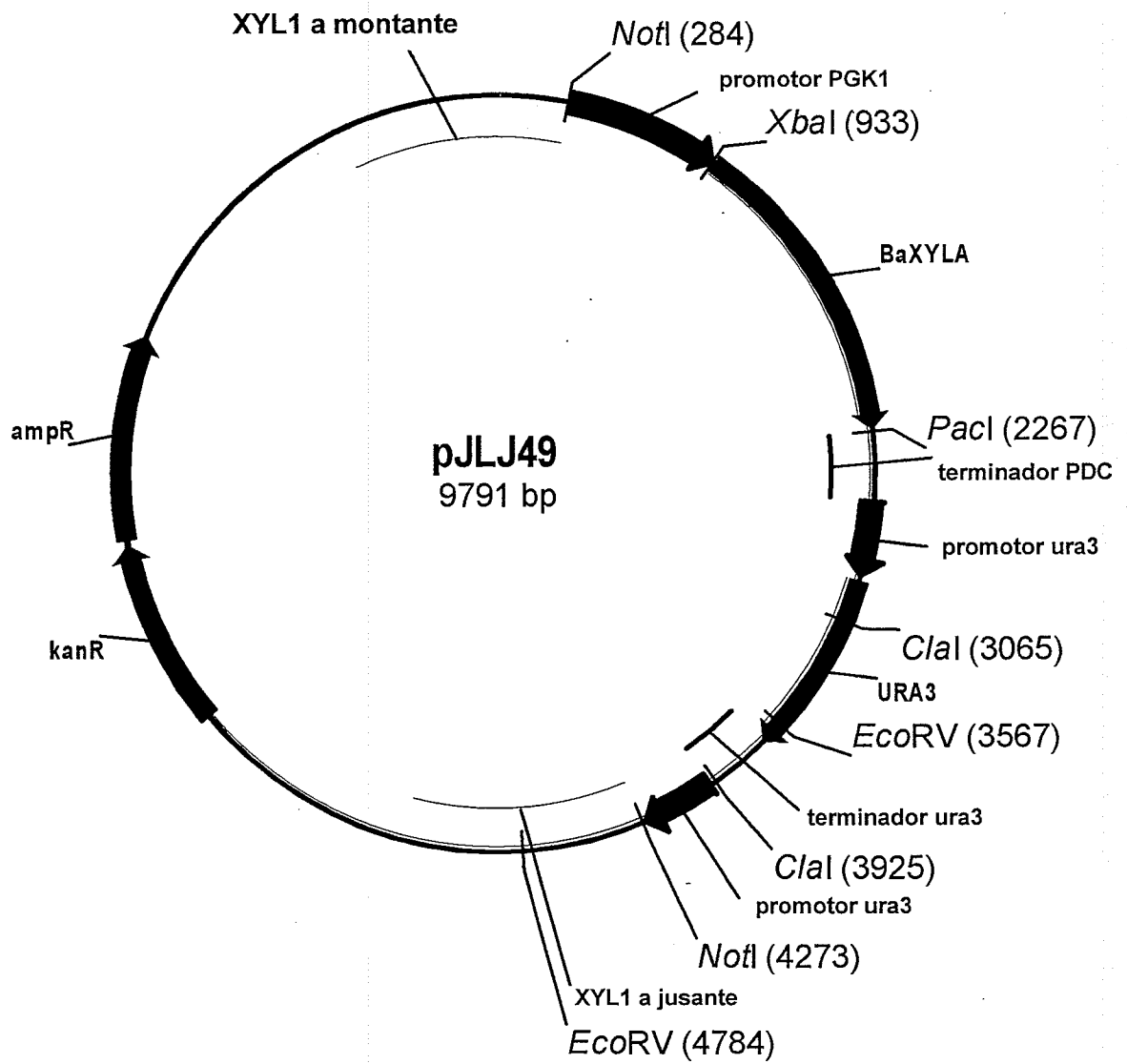


Fig. 25

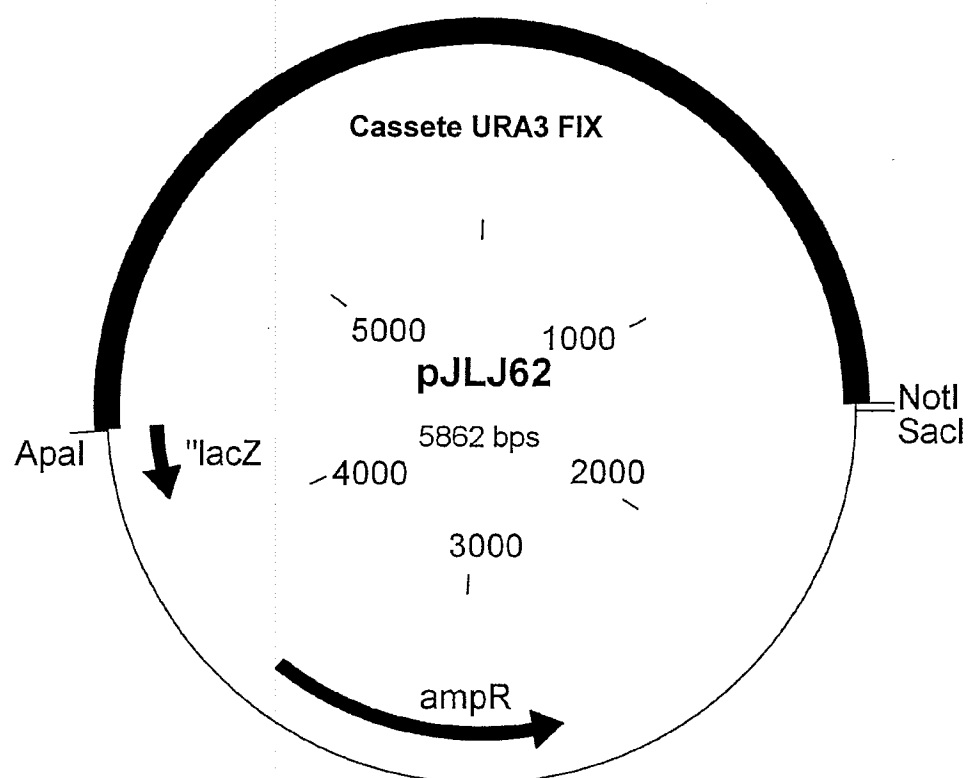


Fig. 26

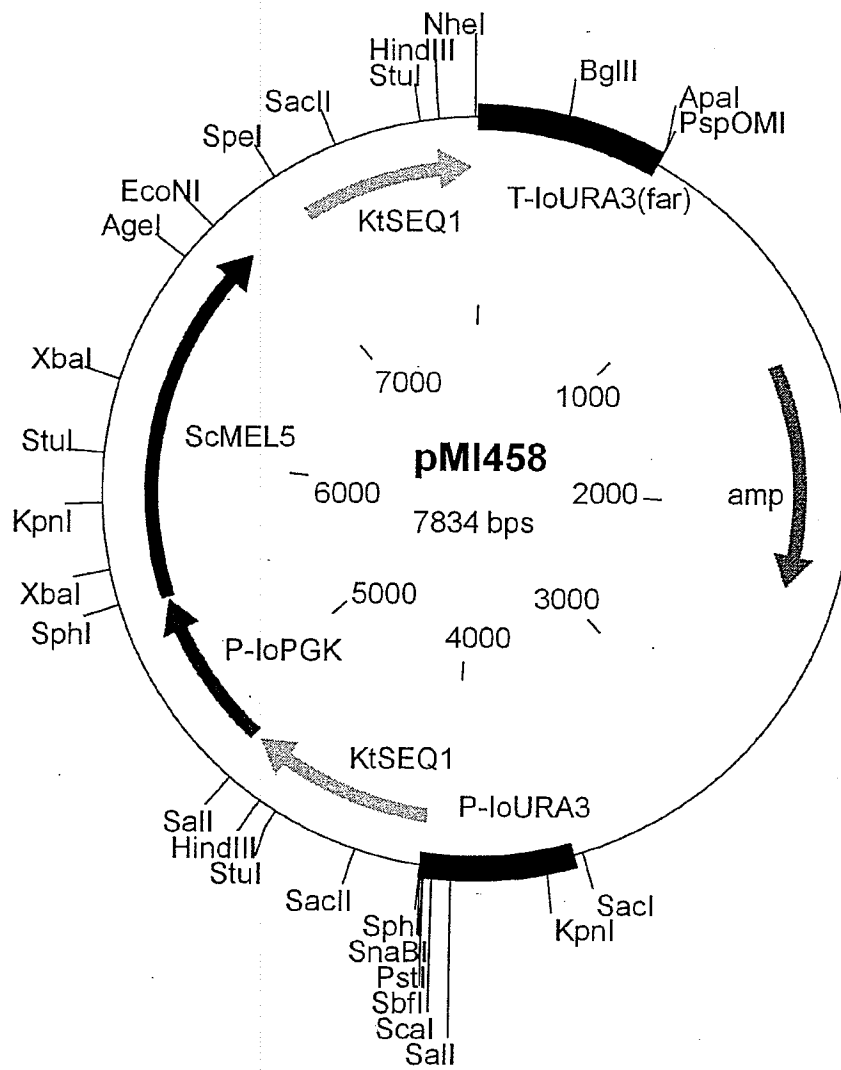


Fig. 27

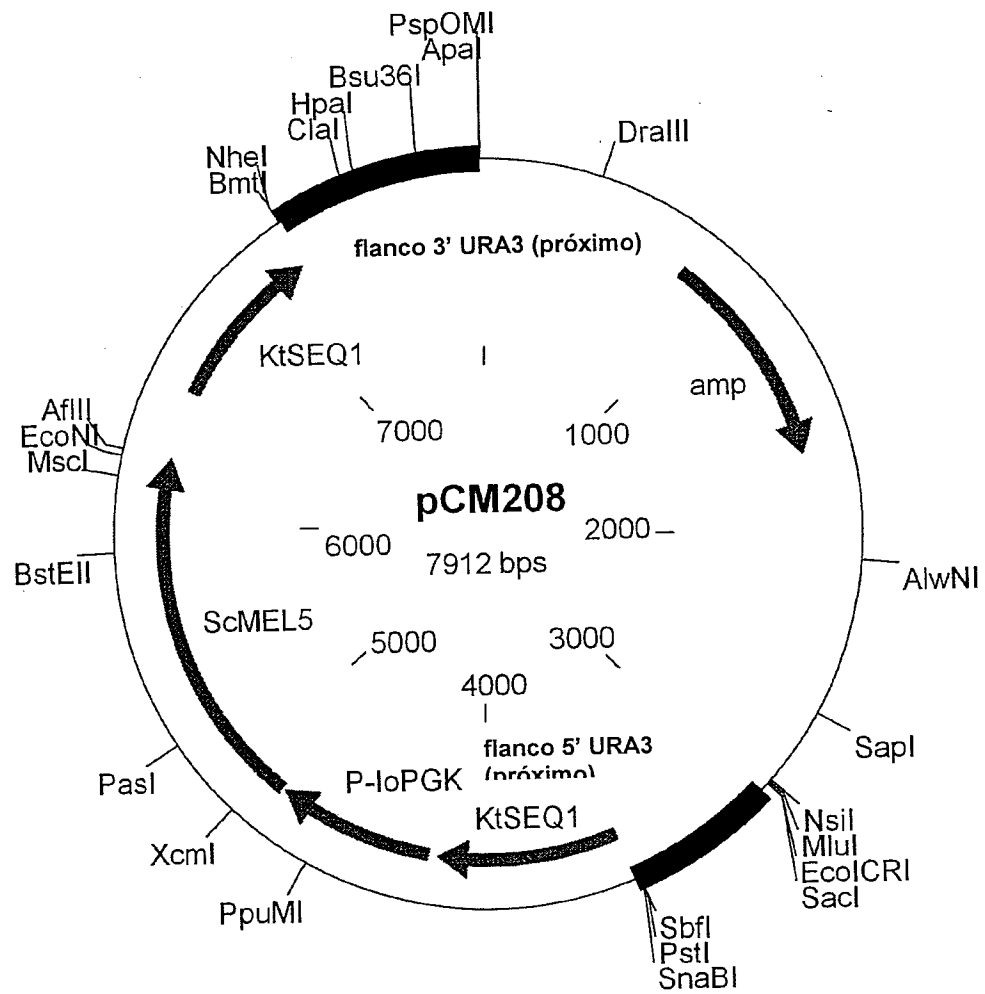


Fig. 28

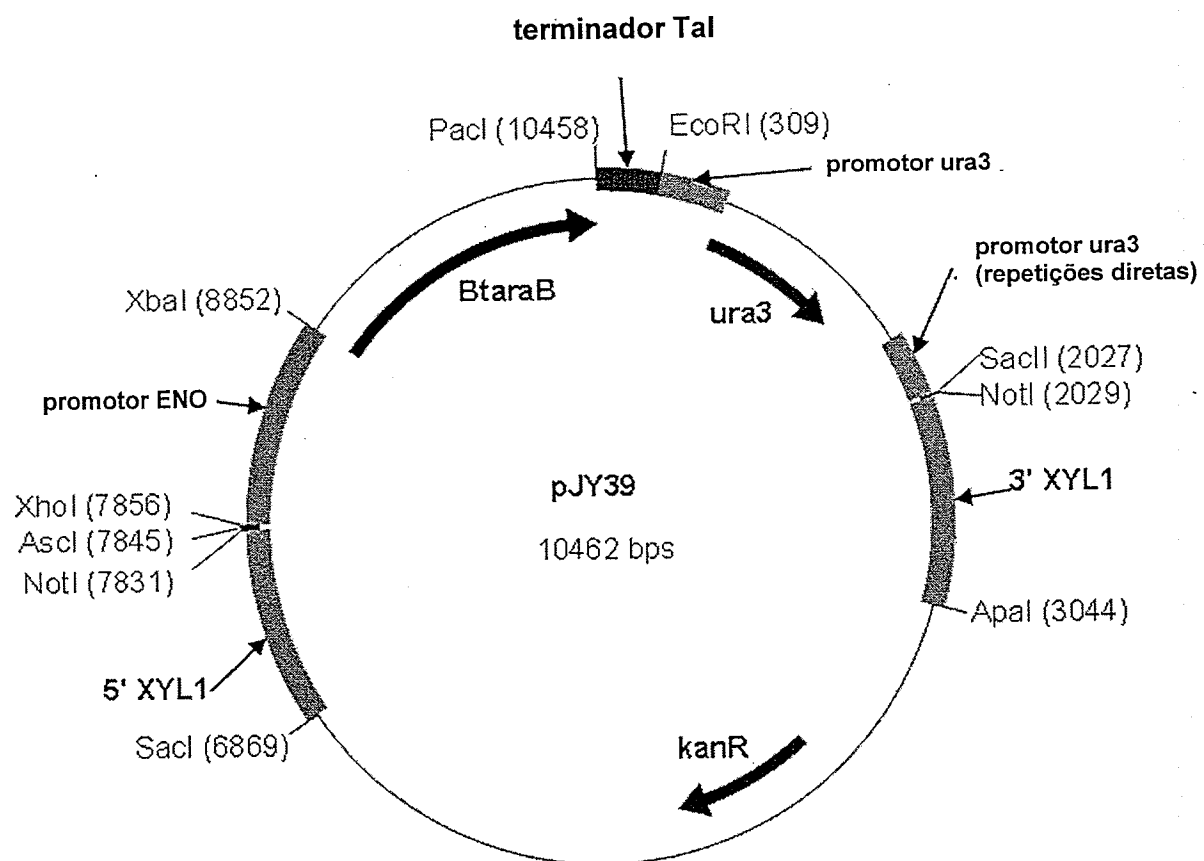


Fig. 29

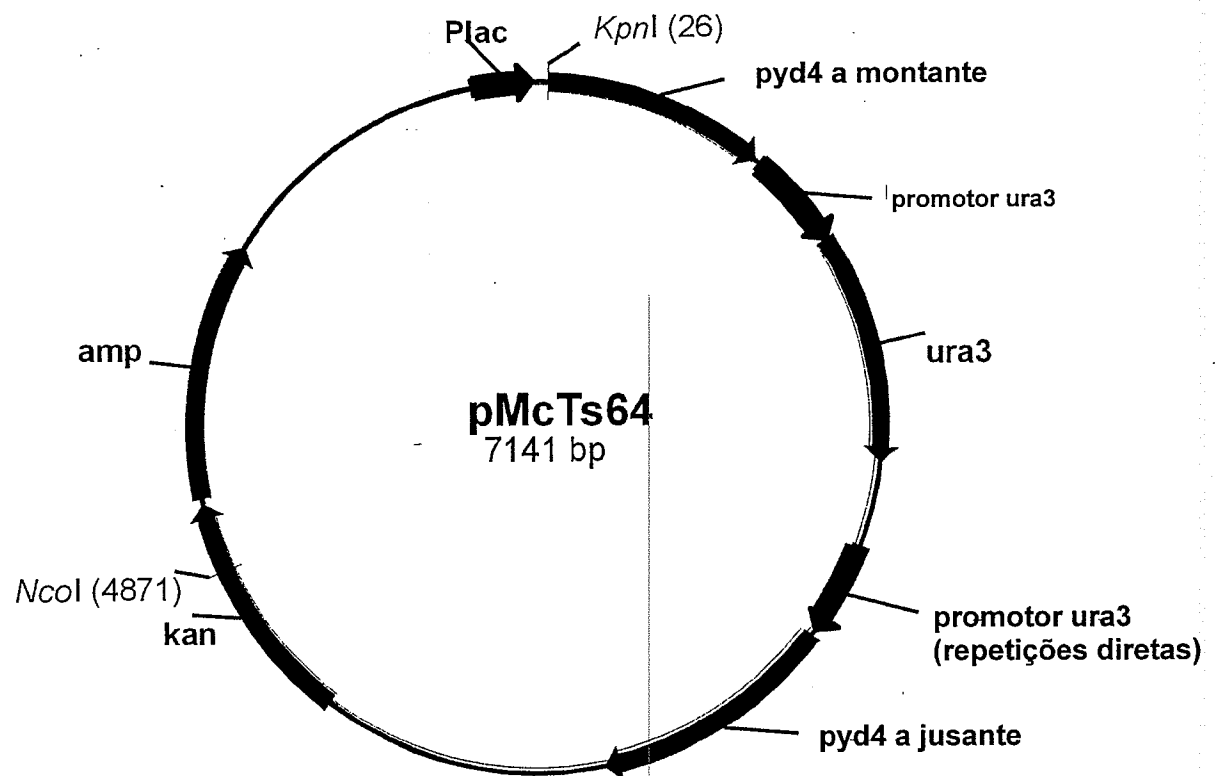


Fig. 30

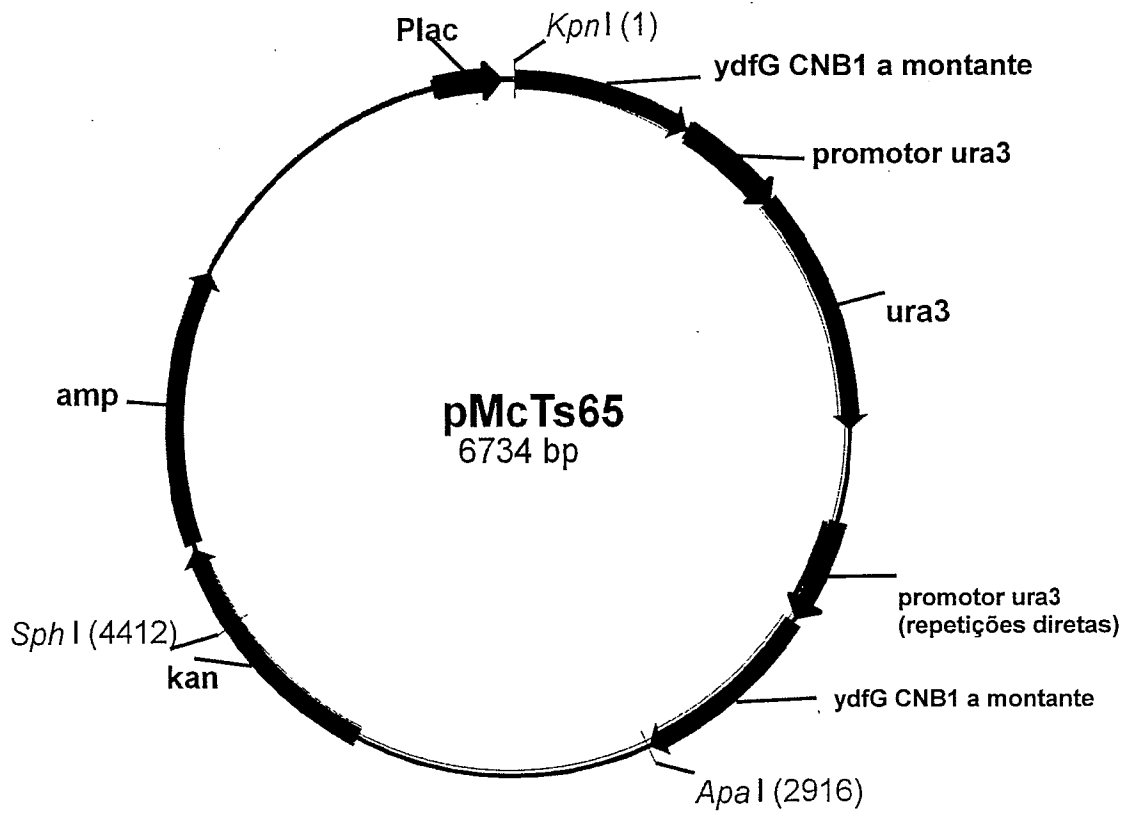


Fig. 31

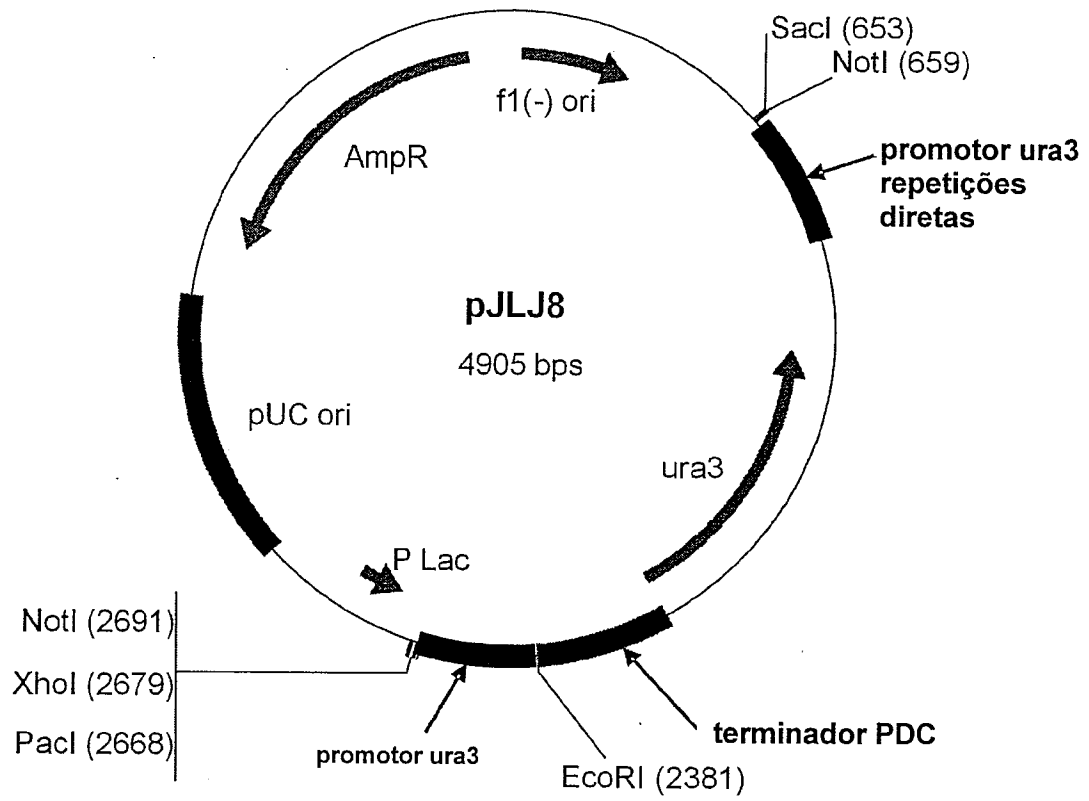


Fig. 32