



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

(21) PI 0909989-1 A2



(22) Data do Depósito: 04/06/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 22/06/2021

(54) Título: CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO

(51) Int. Cl.: C12N 9/10; C12P 7/04; C12P 7/16.

(71) Depositante(es): BUTAMAX ADVANCED BIOFUELS LLC.

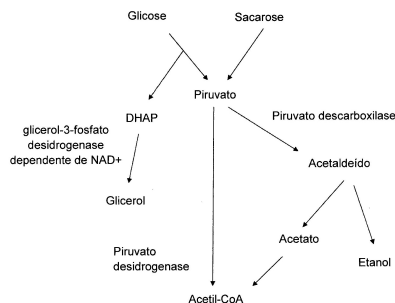
(72) Inventor(es): LARRY CAMERON ANTHONY; LORI ANN MAGGIO-HALL.

(86) Pedido PCT: PCT US2009046226 de 04/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2011/040901 de 07/04/2011

(85) Data da Fase Nacional: 06/12/2010

(57) Resumo: CÉLULAS DE LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO. A presente invenção refere-se a um alto fluxo na conversão de piruvato em acetolactato que foi atingido em levedura através da expressão de acetolactato sintase no citosol em conjunto com redução na atividade da piruvato descarboxitase. Manipulações adicionais para melhorar o fluxo para acetolactato são a atividade reduzida da piruvato desidrogenase e a atividade reduzida da glicerol-3-fosfato desidrogenase. A produção de compostos possuindo acetolactato como um intermediário upstream beneficia-se da conversão aumentada de piruvato em acetolactato nas cepas descritas.



## “CÉLULAS DE LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO”

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo da microbiologia industrial e do metabolismo de leveduras. Mais especificamente, projetar leveduras para um fluxo elevado através de um intermediário acetolactato permite produção aumentada de compostos nas vias incluindo o acetolactato como um substrato *upstream*.

### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O butanol é um importante produto químico industrial, útil como aditivo para combustível, como uma matéria-prima de substâncias químicas na indústria de plásticos e como um extrator de grau alimentício na indústria de alimentos e aroma. Todos os anos, 10 a 12 bilhões de libras de butanol são produzidos através de meios petroquímicos e a necessidade por este produto de consumo químico provavelmente aumentará. A 2-butanona, também conhecida como metiletilcetona (MEK), é um solvente amplamente utilizado e é a cetona mais importante produzida comercialmente, depois da acetona. É utilizada como solvente para tintas, resinas e adesivos, bem como um extrator seletivo, ativador de reações oxidativas e pode ser convertido quimicamente a 2-butanol ao reagir com o hidrogênio na presença de um catalisador (Nystrom, R. F. e Brown, W. G. (*J. Am. Chem. Soc.* (1947) 69:1198). O 2,3-butanodiol pode ser utilizado na síntese química do buteno e do butadieno, os produtos químicos industriais importantes atualmente obtidos a partir do petróleo craqueado e os ésteres de 2,3-butanodiol podem ser utilizados como plastificantes (Voloch *et al.*, *Fermentation Derived 2,3-Butanediol*, em *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press Ltd, Inglaterra, Vol. 2, Seção 3: 933 - 947 (1986)).

Os microrganismos podem ser projetados para expressar as vias

biossintéticas para a produção do 2,3-butanodiol, 2-butanona, 2-butanol e isobutanol. O pedido de patente US 2007/0092957 A1 de propriedade comum e co-pendente descreve a engenharia de microorganismos recombinantes para a produção do isobutanol. Os pedidos de patente US 2007/0259410 A1 e US  
5 2007/0292927 A1 de propriedade comum e co-pendentes descrevem a engenharia de microorganismos recombinantes para a produção da 2-butanona ou 2-butanol. Diversas vias são descritas para a biossíntese do isobutanol e do 2-butanol, todos os quais se iniciam com o piruvato celular. O butanodiol é um intermediário na via do 2-butanol descrito no pedido de patente US  
10 2007/0292927 A1 de propriedade comum e co-pendente.

A produção do 2,3-butanodiol, 2-butanona, 2-butanol e isobutanol em leveduras recombinantes é limitada pela disponibilidade do fluxo de substrato, a partir das vias metabólicas naturais da levedura, nas vias biossintéticas projetadas que produzem estes compostos. Como as vias  
15 biossintéticas para o isobutanol, 2,3-butanodiol, 2-butanol e 2-butanona retiram a produção do piruvato da célula hospedeira, este substrato pode ser uma limitação na formação do produto. A primeira etapa nestas vias projetadas é a conversão do piruvato em acetolactato, que é catalisada pela acetolactato sintase.

20 O metabolismo do piruvato foi alterado na levedura para a produção do ácido láctico e do glicerol. O pedido de patente US 2007/0031950 descreve uma cepa de levedura com uma interrupção em um ou mais genes piruvato descarboxilase ou piruvato desidrogenase e a expressão de um gene D-lactato desidrogenase, que é utilizado para a produção do ácido D-láctico.  
25 Ishida *et al.*, (*Biosci. Biotech. and Biochem.* 70: 1148 - 1153 (2006)) descrevem a *Saccharomyces cerevisiae* com os genes piruvato desidrogenase interrompidos e a expressão da lactato desidrogenase. O pedido de patente US 2005/0059136 descreve cepas de levedura tolerantes à glicose independente

da fonte de carbono C<sub>2</sub> (GCSI) sem atividade de piruvato descarboxilase, que podem conter um gene exógeno lactato desidrogenase. Nevoigt e Stahl (*Yeast* 12: 1331 - 1337 (1996)) descrevem o impacto da redução do piruvato descarboxilase e do aumento do glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD em *Saccharomyces cerevisiae* no rendimento do glicerol.

Para melhorar a produção do isobutanol, 2,3-butanodiol, 2-butanol ou 2-butanona em levedura, o problema ainda a ser resolvido é o de aumentar a conversão do piruvato em acetolactato, que então flui por vias biossintéticas projetadas para produzir estes compostos.

10

#### DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve a constatação de que ao combinar a expressão da atividade enzimática de acetolactato sintase no citosol de levedura com a atividade reduzida da piruvato descarboxilase, um fluxo surpreendentemente alto de piruvato para acetolactato pode ser obtido. A presente invenção fornece células de levedura, que são projetadas para apresentar alta conversão do piruvato endógenos para acetolactato no citoplasma devido à supressão das vias metabólicas competidoras na presença da atividade da acetolactato sintase citosólica. As células de levedura também podem apresentar uma via biossintética completa projetada para a produção do isobutanol, 2,3-butanodiol, 2-butanona ou 2-butanol. A levedura projetada pode ser utilizada para a produção do isobutanol, 2,3-butanodiol, 2-butanona ou 2-butanol, ou outros produtos derivados da acetolactato, tais como a valina, isoleucina e álcool isoamílico.

25

Consequentemente, a presente invenção fornece uma célula de levedura recombinante que compreende pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo localizado no citosol possuindo atividade de acetolactato sintase, em que a célula de levedura é substancialmente livre de uma enzima possuindo atividade de piruvato descarboxilase e em que a célula converte

piruvato em acetolactato. As células de levedura recombinantes preferidas da presente invenção são aquelas contendo interrupções nos genes que codificam as piruvato descarboxilases, piruvato desidrogenases e glicerol-3-fosfato desidrogenases dependentes de NAD.

5           Em outras realizações, a presente invenção fornece células de levedura recombinantes com a capacidade de produzir o 2,3-butanodiol, isobutanol, 2-butanona ou 2-butanol, que compreende pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo localizado no citosol possuindo atividade de acetolactato sintase, em que a célula de levedura é substancialmente livre de  
10       uma enzima possuindo atividade piruvato descarboxilase, e em que a célula converte o piruvato em acetolactato com pelo menos cerca de 60% de rendimento teórico.

          Em outra realização, a presente invenção fornece métodos para a produção do 2,3-butanodiol, isobutanol, 2-butanona ou 2-butanol  
15       compreendendo o cultivo de células de levedura recombinantes da presente invenção em condições em que 2,3-butanodiol, isobutanol, 2-butanona ou 2-butanol é produzido e, opcionalmente, a recuperação do 2,3-butanodiol, isobutanol, 2-butanona ou 2-butanol.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

20           As várias realizações da presente invenção podem ser melhor compreendidas a partir da seguinte Descrição Detalhada da Invenção, das Figuras e das descrições das sequências associadas, que fazem parte do presente pedido de patente.

          A Figura 1 apresenta as vias e enzimas para a utilização do  
25       piruvato.

          A Figura 2 apresenta três diferentes vias biossintéticas do isobutanol.

          A Figura 3 apresenta quatro diferentes vias biossintéticas do 2-

butanol.

A Figura 4 apresenta as relações da sequência da acetolactato sintase (als), que codifica as regiões que foram obtidas pela análise BLAST utilizando a sequência de *B. subtilis* AlsS, limitando aos 100 vizinhos mais próximos. A sequência de codificação als é identificada pelo seu organismo de origem.

A presente invenção pode ser mais bem compreendida a partir da seguinte Descrição Detalhada da Invenção e das descrições das sequências associadas, que fazem parte do presente pedido de patente.

As sequências seguintes estão de acordo com a norma 37 C.F.R. 1.821 – 1.825 (*Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules*) e são consistentes com o padrão E-25 (1998) da World Intellectual Property Organization (WIPO) e os requisitos da listagem de sequência do EPO e PCT (Regras 5.2 e 49.5 (a-bis) e a Seção 208 e Anexo C das Instruções Administrativas). Os símbolos e formato utilizados para os dados de sequência dos nucleotídeos e aminoácidos cumprem as regras estabelecidas na norma 37 CFR § 1.822.

**TABELA 1**

**NÚMEROS DAS SEQ ID DAS REGIÕES DE CODIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO E PROTEÍNAS**

Descrição	SEQ ID No. Ácido nucléico	SEQ ID No. Aminoácido
<i>Klebsiella pneumoniae budB</i> (acetolactato sintase)	1	2
<i>Bacillus subtilis alsS</i> (acetolactato sintase)	3	4
<i>Lactococcus lactis als</i> (acetolactato sintase)	5	6
<i>Als Staphylococcus aureus</i>	7	8
<i>Als Listeria monocytogenes</i>	9	10
<i>Als Streptococcus mutans</i>	11	12

Descrição	SEQ ID No. Ácido nucléico	SEQ ID No. Aminoácido
<i>Als Streptococcus thermophilus</i>	13	14
<i>Als Vibrio angustum</i>	15	16
<i>Als Bacillus cereus</i>	17	18
<i>budA</i> , acetolactato descarboxilase da <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955	19	20
<i>alsD</i> , acetolactato descarboxilase da <i>Bacillus subtilis</i>	21	22
<i>budA</i> , acetolactato descarboxilase da <i>Klebsiella terrigena</i>	23	24
<i>budC</i> , butanodiol desidrogenase da <i>Klebsiella pneumoniae</i> IAM1063	25	26
Butanodiol desidrogenase da <i>Bacillus cereus</i>	27	28
<i>butB</i> , butanodiol desidrogenase da <i>Lactococcus lactis</i>	29	30
<i>RdhtA</i> , B12- <i>indep</i> da diol desidratase da <i>Roseburia inulinivorans</i>	31	32
<i>RdhtB</i> , B12- <i>indep</i> da diol desidratase reativase da <i>Roseburia inulinivorans</i>	33	34
<i>sadB</i> , butanol desidrogenase da <i>Achromobacter xylooxidans</i>	35	36
<i>S. cerevisiae</i> ILV5 (ácido acetohidróxi redutoisomerase)	37	38
<i>Vibrio cholerae</i> cetol-ácido redutoisomerase	39	40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cetol-ácido redutoisomerase	41	42
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cetol-ácido redutoisomerase	43	44
<i>S. cerevisiae</i> ILV3 (diidróxiácido desidratase; DHAD)	45	46
<i>Lactococcus lactis</i> <i>kivD</i> (ácido $\alpha$ -ceto	47	48

Descrição	SEQ ID No. Ácido nucléico	SEQ ID No. Aminoácido
descarboxilase de cadeia ramificada), códon otimizado		
<i>Lactococcus lactis</i> kivD (ácido $\alpha$ -ceto descarboxilase de cadeia ramificada)	49	48*
<i>Pseudomonas fluorescens</i> mutante Pf5.IlvC-Z4B8 do ácido acetohidróxi redutoisomerase	168	169
<i>Bacillus subtilis</i> kivD códon otimizado para a expressão da <i>S. cerevisiae</i>	172	173
<i>Equus caballus</i> álcool desidrogenase de códon otimizada para a expressão da <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	174	175
<i>Streptococcus mutans</i> ilvD (DHAD)	185	186

\* A mesma sequência de aminoácidos é codificada pela SEQ ID  
Nos. 47 e 49.

## TABELA 2

### NÚMEROS DAS SEQ ID DAS REGIÕES DE CODIFICAÇÃO DO GENE ALVO DE

5

#### INTERRUPÇÃO E PROTEÍNAS

Descrição	SEQ ID No. Ácido nucléico	SEQ ID No. Aminoácido
PDC1 piruvato descarboxilase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50	51
PDC5 piruvato descarboxilase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52	53
PDC6 piruvato descarboxilase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54	55
Piruvato descarboxilase da <i>Candida</i> <i>glabrata</i>	56	57
PDC1 piruvato descarboxilase da <i>Pichia</i> <i>stipitis</i>	58	59

Descrição	SEQ ID No. Ácido nucléico	SEQ ID No. Aminoácido
PDC2 piruvato descarboxilase da <i>Pichia stipitis</i>	60	61
Piruvato descarboxilase da <i>Kluyveromyces lactis</i>	62	63
Piruvato descarboxilase da <i>Yarrowia lipolítica</i>	64	65
Piruvato descarboxilase da <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	66	67
GPD1 glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68	69
GPD2 glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70	71
GPD1 glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD da <i>Pichia stipitis</i>	72	73
GPD2 glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD da <i>Pichia stipitis</i>	74	75
Glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD da <i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	76	77
GPD1 glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD da <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	78	79
GPD2 glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD da <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	80	81
PDA1, piruvato desidrogenase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82	83
PDB1, piruvato desidrogenase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84	85
Lat1 complexo piruvato desidrogenase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86	87

Descrição	SEQ ID No. Ácido nucléico	SEQ ID No. Aminoácido
Lpd1 complexo piruvato desidrogenase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88	89
Pdx1 complexo piruvato desidrogenase da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90	91
PDA1, Piruvato desidrogenase da <i>Pichia stipitis</i>	92	93
PDB1, Piruvato desidrogenase da <i>Pichia stipitis</i>	94	95
Piruvato desidrogenase da <i>Kluyveromyces lactis</i>	96	97
PDA1, Piruvato desidrogenase da <i>Schizosacharomyces pombe</i>	98	99
PDB1, Piruvato desidrogenase da <i>Schizosacharomyces pombe</i>	100	101

As SEQ ID Nos.:102 - 113, 117 - 134, 127 - 134, 136, 137, 139 - 164, 178, 179, 181, 182, 189 - 197, 199 - 205 e 207 - 208 são o sequenciamento e os *primers* utilizados e descritos nos exemplos.

A SEQ ID No. 114 é o promotor GPD1 da *S. cerevisiae*.

5 A SEQ ID No. 115 é o terminador CYC1 da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 116 é o promotor FBA da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 125 é o promotor CUP1 da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 126 é o terminator ADH1 da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 135 é o promotor GPM1 da *S. cerevisiae*.

10 A SEQ ID No. 138 é a sequência de um fragmento sintético contendo regiões de codificação para a desidratase e a reativase do diol independente de B<sub>12</sub> da *Roseburia inulinivorans*.

A SEQ ID No. 143 é o terminador duplo.

A SEQ ID No. 165 é a sequência do vetor pLH475-Z4B8.

A SEQ ID No. 166 é o terminator CYC1-2 da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 167 é o promotor ILV5 da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 170 é o terminador ILV5 da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 171 é a sequência do vetor pLH468.

5 A SEQ ID No. 176 é a sequência do vetor pNY8.

A SEQ ID No. 177 é o promotor GPD1-2 da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 180 é a sequência do vetor pRS425::GPM sadB.

A SEQ ID No. 183 é a sequência do vetor pRS423 FBA ilvD  
(Strep).

10 A SEQ ID No. 184 é o terminator FBA da *S. cerevisiae*.

A SEQ ID No. 187 é a sequência do fragmento GPM-sadB-ADHt.

A SEQ ID No. 188 é a sequência do vetor pUC19-URA3r.

A SEQ ID No. 198 é a sequência do fragmento ilvD-FBA1t.

A SEQ ID No. 206 é a sequência do DNA molde marcador  
15 URA3r2.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se às células de levedura recombinantes projetadas para melhorar a produção do acetolactato e dos compostos contendo acetolactato como um intermediário *upstream* incluindo o  
20 isobutanol, 2,3-butanodiol, 2-butanona e 2-butanol. Além disso, a presente invenção se refere aos métodos de produção destes compostos utilizando a presente célula de levedura projetada. O isobutanol, 2,3-butanodiol, 2-butanona e 2-butanol são compostos importantes para a utilização na substituição dos combustíveis fósseis, diretamente ou como intermediários para outras sínteses  
25 químicas, além das aplicações como solventes e/ou extratores.

As seguintes abreviaturas e definições serão utilizadas para a interpretação das reivindicações e do relatório descritivo.

Conforme utilizado no presente, os termos “compreende”,

“compreendendo”, “inclui”, “incluindo”, “possui”, “possuindo”, “contém” ou “contendo” ou qualquer outra variação dos mesmos, se destinam a abranger uma inclusão não-exclusiva. Por exemplo, uma composição, uma mistura, processo, método, artigo ou equipamento que compreende uma lista de elementos não estão necessariamente limitados a apenas esses elementos, mas podem incluir outros elementos que não estejam expressamente listados ou sejam inerente a tal composição, mistura, processo, método, artigo ou equipamento. Além disso, a menos que expressamente indicado em contrário, “ou” se refere a uma inclusão e não a uma exclusão. Por exemplo, uma condição A ou B é satisfeita por qualquer um dos seguintes procedimentos: A é verdadeiro (ou presente) e B é falso (ou não presente), A é falso (ou não presente) e B é verdadeira (ou atual), e ambos A e B são verdadeiras (ou presente).

Além disso, os artigos indefinidos “um” e “uma” que precedem um elemento ou componente da presente invenção pretendem ser não restritivos em relação ao número de exemplos (isto é, ocorrências) do elemento ou componente. Portanto, “um” ou “uma” devem ser interpretados de modo a incluir um ou pelo menos um, e a forma singular da palavra do elemento ou componente também inclui o plural, a menos que o número esteja obviamente no singular.

O termo “invenção” ou “presente invenção”, utilizado no presente é um termo não limitante e não pretende se referir a qualquer realização singular da presente invenção, mas engloba todas as possíveis realizações conforme descritas no relatório descritivo e nas reivindicações.

Conforme utilizado no presente, o termo “cerca de”, que modifica a quantidade de um ingrediente ou reagente da presente invenção, se refere a variação na quantidade numérica que pode ocorrer, por exemplo, através da medição típica e dos procedimentos para a manipulação de líquidos utilizada

na fabricação de concentrados ou da utilização de soluções na prática, através do erro involuntário nestes procedimentos; através de diferenças de fabricação, fonte ou grau de pureza dos ingredientes empregados para a produção das composições ou realização dos métodos; e similares. O termo “cerca de”  
5 também engloba as quantidades que diferem devido a diferentes condições de equilíbrio para uma composição resultante de uma determinada mistura inicial. Sejam ou não modificadas pelo termo “cerca de”, as reivindicações incluem equivalentes para as quantidades. Em uma realização, o termo “cerca de” significa dentro de 10% do valor numérico relatado, de preferência, dentro de  
10 5% do valor numérico relatado.

O termo “butanol”, conforme utilizado no presente, se refere ao 2-butanol, 1-butanol, isobutanol, ou suas misturas.

O termo “via biossintética do isobutanol” se refere a uma via da enzima para a produção do isobutanol a partir do piruvato.

15 O termo “via biossintética do 2-butanol” se refere a uma via da enzima para a produção do 2-butanol a partir do piruvato.

O termo “via biossintética da 2-butanona” se refere a uma via da enzima para a produção da 2-butanona a partir do piruvato.

Os termos “acetolactato sintase” e “acetolactato sintetase” são  
20 utilizados intercambiavelmente no presente para se referir a uma enzima que catalisa a conversão do piruvato em acetolactato e CO<sub>2</sub>. Os acetolactatos sintases preferidos são conhecidos pelo número EC 2.2.1.6 (*Enzyme Nomenclature* 1992, Academic Press, San Diego). Essas enzimas estão disponíveis a partir de diversas fontes, incluindo, mas não se limitando a,  
25 *Bacillus subtilis* (DNA: SEQ ID No. 3; proteína: SEQ ID No. 4), *Klebsiella pneumoniae* (DNA: SEQ ID No. 1; proteína: SEQ ID No. 2) e *Lactococcus lactis* (DNA: SEQ ID No. 5; proteína: SEQ ID No. 6).

O termo “acetolactato descarboxilase” se refere a um polipeptídeo

(ou polipeptídeos), com uma atividade enzimática que catalisa a conversão da alfa-acetolactato em acetoína. A acetolactato descarboxilase é conhecida como EC 4.1.1.5 e está disponível, por exemplo, pela *Bacillus subtilis* (DNA: SEQ ID No. 21, proteína: SEQ ID No. 22), *Klebsiella terrigena* (DNA: SEQ ID No. 23, proteína: SEQ ID No. 24) e *Klebsiella pneumoniae* (DNA: SEQ ID No. 19, proteína: SEQ ID No. 20).

O termo “butanodiol desidrogenase” também conhecido como “acetoína redutase” se refere a um polipeptídeo (ou polipeptídeos), com uma atividade enzimática que catalisa a conversão da acetoína em 2,3-butanodiol. As butanodiol desidrogenases são um subconjunto da ampla família de desidrogenases do álcool. As enzimas butanodiol desidrogenase podem ter especificidade para a produção da estereoquímica (R) ou (S) no produto álcool. As desidrogenases do butanodiol (S)-específicas são conhecidas como EC 1.1.1.76 e estão disponíveis, por exemplo, pela *Klebsiella pneumoniae* (DNA: SEQ ID No. 25, proteína: SEQ ID No. 26). As desidrogenases do butanodiol (R)-específicas são conhecidas como EC 1.1.1.4 e estão disponíveis, por exemplo, pelo *Bacillus cereus* (DNA: SEQ ID No. 27, proteína: SEQ ID No. 28) e *Lactococcus lactis* (DNA: SEQ ID No. 29, proteína: SEQ ID No. 30).

O termo “substancialmente livre” quando utilizado em referência à presença ou ausência das atividades enzimáticas (piruvato descarboxilase, piruvato desidrogenase, glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD) nas vias do carbono que competem com a presente via do isobutanol significa que o nível da enzima é substancialmente inferior ao da mesma enzima no hospedeiro do tipo selvagem, em que menos de cerca de 20% do nível do tipo selvagem é preferido e menos de cerca de 10% do nível do tipo selvagem é o de maior preferência. A atividade pode ser inferior a cerca de 5% ou 1% da atividade do tipo selvagem.

O termo “anaeróbio facultativo” se refere a um microorganismo

que pode crescer em ambos os ambientes aeróbios e anaeróbios.

O termo “substrato de carbono” ou “substrato de carbono fermentável” se refere a uma fonte de carbono capaz de ser metabolizada pelos organismos hospedeiros descritos no presente e, em particular, às fontes de carbono selecionadas a partir do grupo que consiste em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. O termo “gene” se refere a um fragmento de ácido nucléico que é capaz de ser expresso como uma proteína específica, incluindo opcionalmente as sequências reguladoras anteriores (sequências não de codificação 5') e posteriores (sequências não de codificação 3') à sequência de codificação. “Gene nativo” se refere a um gene tal conforme encontrado na natureza com as suas próprias sequências reguladoras. “Gene quimérico” se refere a qualquer gene que não é um gene nativo, que compreende as sequências reguladoras e de codificação que não são encontradas juntas na natureza. Consequentemente, um gene quimérico pode incluir as sequências reguladoras e as sequências de codificação que são provenientes de fontes diferentes, ou as sequências reguladoras e as sequências de codificação provenientes da mesma origem, mas dispostas de maneira diferente daquela encontrada na natureza. “Gene endógeno” se refere a um gene nativo em sua posição natural no genoma de um organismo. Um “gene exógeno” ou “gene heterólogo” se refere a um gene normalmente não encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido no organismo hospedeiro por transferência de genes. Os genes exógenos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não-nativo, ou genes quiméricos. Um “transgene” é um gene que foi introduzido no genoma por um processo de transformação.

Conforme utilizado no presente, o termo “região de codificação” se refere a uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminoácido específica. “Sequências reguladoras apropriadas” se referem às sequências de nucleotídeos localizadas *upstream* (sequências não-de codificação 5'), dentro

ou *downstream* (sequências não-de codificação 3') de uma sequência de codificação, e que influenciam na transcrição, no processamento ou na estabilidade do RNA, ou na tradução da sequência de codificação associada. As sequências reguladoras podem incluir promotores, sequências líder de  
5 tradução, íntrons, sequências de reconhecimento para poliadenilação, o sítio de processamento do RNA, sítio de ligação efetora e estrutura secundária do tipo laço.

O termo "promotor" se refere a uma sequência de DNA capaz de controlar a expressão de uma sequência de codificação ou RNA funcional. Em  
10 geral, uma sequência de codificação está localizada a 3' de uma sequência promotora. Os promotores podem ser obtidos integralmente a partir de um gene nativo, ou serem compostos por diversos elementos provenientes de diferentes promotores encontrados na natureza, ou mesmo compreender segmentos de DNA sintético. É compreendido pelo técnico no assunto que os  
15 diferentes promotores podem orientar a expressão de um gene em diferentes tecidos ou tipos celulares, ou em diferentes estágios de desenvolvimento, ou em resposta a diferentes condições ambientais ou fisiológicas. Os promotores que ocasionam a expressão de um gene na maior parte dos tipos celulares são, na maioria das vezes, comumente referidos como "promotores  
20 constitutivos". Ainda se reconhece também que, na maioria dos casos, os limites exatos das sequências reguladoras não foram completamente definidos, os fragmentos de DNA de tamanhos diferentes podem possuir atividade promotora idêntica.

O termo "operavelmente ligado" se refere à associação de  
25 sequências de ácidos nucléicos em um único fragmento de ácido nucléico para que a função de um seja afetada pelo outro. Por exemplo, um promotor é operavelmente ligado a uma sequência de codificação quando é capaz de efetuar a expressão daquela sequência de codificação (isto é, que a sequência

de codificação está sob o controle transcricional do promotor). As sequências de codificação podem ser operavelmente ligadas às sequências reguladoras na orientação senso ou antisenso.

O termo “expressão”, conforme utilizado no presente, se refere à transcrição e ao acúmulo estável de senso (mRNA). A expressão pode também se referir a tradução do mRNA em um polipeptídeo.

Conforme utilizado no presente, o termo “transformação” se refere à transferência de uma molécula de ácido nucléico em uma célula hospedeira, que pode ser mantida como um plasmídeo ou integrado no genoma. As células hospedeiras contendo as moléculas de ácido nucléico transformadas são referidas como células “transgênicas” ou “recombinantes” ou “transformadas”.

Os termos “plasmídeo” e “vetor”, conforme utilizados no presente, se referem a um elemento cromossômico adicional que muitas vezes portam os genes que não fazem parte do metabolismo central da célula e, geralmente, na forma de moléculas de DNA circular de fita dupla. Tais elementos podem ser sequências de replicação autônomas, sequências de integração do genoma, fago ou sequências de nucleotídeos, linear ou circular, de um DNA ou RNA de fita simples ou dupla, derivadas de qualquer fonte, em que uma série de sequências de nucleotídeos foi unida ou recombinada em uma construção única que é capaz de introduzir um fragmento promotor e a sequência de DNA para um produto do gene selecionado junto com a sequência não traduzida 3' adequada em uma célula.

Conforme utilizado no presente, o termo “degeneração do códon” se refere à natureza do código genético que permite a variação da sequência de nucleotídeos sem afetar a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo codificado. O técnico no assunto está bem ciente do “códon”.

O termo “códon otimizado”, uma vez que ele se refere regiões de codificação de moléculas de ácido nucléico para a transformação de diversos

hospedeiros, se refere à alteração de códons nas regiões de codificação das moléculas de ácido nucléico para refletir a utilização do códon típico do organismo hospedeiro sem alterar o polipeptídeo codificado pelo DNA. “*On-bias*”, exibido por uma célula hospedeira específica na utilização de códons de nucleotídeos para especificar um determinado aminoácido. Portanto, ao sintetizar uma região de codificação para uma expressão aprimorada em uma célula hospedeira, é desejável construir a região de codificação de tal forma que sua frequência de utilização do códon se aproxime da frequência de utilização do códon preferido da célula hospedeira.

Conforme utilizado no presente, um “fragmento isolado de ácido nucléico” ou “molécula isolada de ácido nucléico” serão utilizados intercambiavelmente e significará um polímero de RNA ou DNA de fita simples ou dupla, opcionalmente contendo bases de nucleotídeos sintéticas, não naturais ou alteradas. Um fragmento de ácido nucléico isolado na forma de um polímero de DNA pode ser composto por um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico ou DNA sintético.

Um fragmento de ácido nucléico é “hibridizável” em outro fragmento de ácido nucléico, tal como um cDNA, DNA genômico ou molécula de RNA, quando uma única forma de fita simples do ácido nucléico pode anelar em outro fragmento de ácido nucléico nas condições apropriadas de temperatura e solução de força iônica. A hibridação e as condições de lavagem são bem conhecidas e exemplificadas em Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989), nomeadamente o capítulo 11 e a Tabela 11.1 do mesmo (incorporado integralmente no presente como referência). As condições de temperatura e força iônica determinam o “rigor” da hibridação. As condições rigorosas podem ser ajustadas para selecionar fragmentos moderadamente semelhantes (tais como as sequências homólogas

de organismos remotamente relacionados), a fragmentos muito similares (tais como genes que duplicam enzimas funcionais a partir de organismos estreitamente relacionados). As lavagens pós-hibridação determinam as condições rigorosas. Um conjunto de condições preferidas utiliza uma série de lavagens começando com 6X SSC, SDS 0,5% em temperatura ambiente por 5 15 min, em seguida, repetido com 2X SSC, SDS 0,5% a 45° C por 30 min, e depois repetido duas vezes com 0,2 X SSC, SDS 0,5% a 50° C por 30 min. Um conjunto de maior preferência de condições rigorosas utiliza temperaturas mais altas em que as lavagens são idênticas àquelas acima, exceto para a 10 temperatura das duas lavagens final de 30 min em 0,2 X SSC, SDS 0,5% que foi aumentada para 60° C. Outro conjunto preferido de condições altamente rigorosas utiliza duas lavagens finais em 0,1 X SSC, SDS 0,1% a 65° C. Um conjunto adicional de condições rigorosas inclui a hibridação 0,1X SSC, SDS 0,1%, 65° C e lavagens com 2X SSC, SDS 0,1%, seguido por 0,1X SSC, SDS 15 0,1%, por exemplo.

A hibridação exige que os dois ácidos nucléicos contenham sequências complementares, embora dependendo do rigor da hibridação, erros de pareamento entre as bases são possíveis. O rigor apropriado para a hibridação dos ácidos nucléicos depende do comprimento dos ácidos nucléicos e do grau de complementação, variáveis bem conhecidas no estado da técnica. Quanto maior o grau de similaridade ou homologia entre duas sequências de nucleotídeos, maior o valor de  $T_m$  para os híbridos de ácidos nucléicos possuindo essas sequências. A estabilidade relativa (correspondente ao maior  $T_m$ ) das hibridações de ácido nucléico diminui na seguinte ordem: RNA:RNA, 20 DNA:RNA, DNA:DNA. Para os híbridos superiores a 100 nucleotídeos de comprimento, as equações para calcular o  $T_m$  foram derivadas (vide Sambrook *et al.*, acima, 9,50 - 9,51). Para as hibridações com ácidos nucléicos menores, isto é, oligonucleotídeos, a posição dos erros de pareamento se torna mais 25

importante e o comprimento do oligonucleotídeo determina a sua especificidade (vide Sambrook *et al.*, acima, 11,7 – 11,8). Em uma realização, o comprimento para um ácido nucléico hibridizável é pelo menos de cerca de 10 nucleotídeos. De preferência, um comprimento mínimo para um ácido nucléico hibridizável é de pelo menos cerca de 15 nucleotídeos, de maior preferência, pelo menos cerca de 20 nucleotídeos, e de maior preferência, ainda, o comprimento é de pelo menos cerca de 30 nucleotídeos. Além disso, o técnico no assunto irá reconhecer que a temperatura e a concentração da solução salina de lavagem podem ser ajustadas conforme necessário, de acordo com fatores, tais como o comprimento da sonda.

A “porção substancial” de um aminoácido ou uma sequência de nucleotídeos é a porção que compreende o suficiente da sequência de aminoácidos de um polipeptídeo ou da sequência de nucleotídeos de um gene para supostamente identificar o polipeptídeo ou gene, quer pela avaliação manual da sequência por um técnico no assunto, ou pela comparação e identificação da sequência automatizada em computador utilizando algoritmos, tais como BLAST (Altschul, SF, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403 - 410 (1993)). Em geral, uma sequência de dez ou mais aminoácidos contíguos ou trinta ou mais nucleotídeos é necessária de modo a supostamente identificar um polipeptídeo ou uma sequência de ácido nucléico como homóloga a uma proteína ou gene conhecido. Além disso, com relação às sequências de nucleotídeos, as sondas de oligonucleotídeos gene específico que compreendem de 20 a 30 nucleotídeos contíguos podem ser utilizadas em métodos dependentes da sequência na identificação de genes (por exemplo, a hibridação de Southern) e o isolamento (por exemplo, hibridação *in situ* de colônias bacterianas ou placas bacteriófagas). Além disso, os oligonucleotídeos curtos de 12 a 15 bases podem ser utilizados como *primers* amplificados por PCR, de modo a obter um determinado fragmento de ácido nucléico que compreende os *primers*. Deste

modo, uma “porção substancial” de uma sequência de nucleotídeos compreende o suficiente da sequência para identificar e/ou isolar especificamente um fragmento de ácido nucléico que compreende a sequência. O presente relatório descritivo ensina a sequência completa de aminoácido e nucleotídeo que codifica determinadas proteínas. O técnico no assunto, possuindo o benefício das sequências conforme relatado no presente, pode utilizar todos ou uma parte substancial das sequências descritas para os propósitos conhecidos pelos técnicos no assunto. Assim, a presente invenção compreende as sequências completas, conforme relatadas na Listagem de Sequência anexa, bem como as porções substanciais daquelas sequências conforme definidas acima.

O termo “complementar” é utilizado para descrever a relação entre as bases de nucleotídeos que são capazes de hibridizar entre si. Por exemplo, com relação ao DNA, a adenosina é a complementar da timina e a citosina é a complementar da guanina.

O termo “porcentagem de identidade”, tal como é conhecido no estado da técnica, é uma relação entre duas ou mais sequências de polipeptídeos ou duas ou mais sequências de polinucleotídeos, conforme determinado pela comparação das sequências. No estado da técnica, “identidade” também significa o grau de parentesco da sequência entre as sequências de polipeptídeos ou polinucleotídeos, conforme for o caso, determinado pelo pareamento entre as fitas de tais sequências. A “identidade” e a “semelhança” podem ser facilmente calculadas através dos métodos conhecidos incluindo, mas não limitados aos descritos em: (1) *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University: NY (1988); (2) *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., Ed.) Academic: NY (1993); (3) *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., Eds.) Humana: NJ (1994); (4) *Sequence Analysis in Molecular*

*Biology* (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987); e (5) *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. and Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991).

Os métodos preferidos para determinar a identidade são projetados para fornecer o melhor pareamento entre os grupos testados. Os métodos para determinar a identidade e a similaridade são codificados em programas de computador disponíveis publicamente. Os alinhamentos da sequência e os cálculos de identidade percentuais podem ser realizados utilizando o programa MegAlign<sup>®</sup> do software de computação de bioinformática Lasergene<sup>®</sup> (DNASTAR Inc., Madison, WI). O alinhamento múltiplo das sequências é realizado utilizando o “método de alinhamento Clustal”, que engloba diversas variedades do algoritmo, incluindo o “método de alinhamento Clustal V” correspondente ao método de alinhamento designado Clustal V (descrito por Higgins e Sharp, *CABIOS*. 5: 151 – 153 (1989), Higgins, DG *et al.*, *Comput. Appl. Biosci.*, 8: 189 – 191 (1992)) e encontrado no programa MegAlign<sup>®</sup> do software de computação de bioinformática Lasergene<sup>®</sup> (DNASTAR Inc.). Para alinhamentos múltiplos, os valores padrão correspondem a Penalidade para Espaços = 10 e a Penalidade para Comprimento = 10. Os parâmetros predefinidos para os alinhamentos de pares e o cálculo da identidade percentual das sequências de proteína utilizando o método Clustal são Ktuple = 1, Penalidade para Espaços = 3, Janela = 5 e Diagonais Preservadas = 5. Para os ácidos nucleicos, estes parâmetros são Ktuple = 2, Penalidade para Espaços = 5, Janela = 4 e Diagonais Preservadas = 4. Após o alinhamento das sequências utilizando o programa Clustal V, é possível obter uma “porcentagem de identidade”, visualizando a tabela de “distâncias da sequência”, no mesmo programa. Além disso, o “método de alinhamento Clustal W” está disponível e corresponde ao método de alinhamento designado Clustal W (descrito por Higgins e Sharp, *Cabios*. 5: 151 - 153 (1989); Higgins, D.G. *et al.*, *Comput. Appl. Biosci.*, 8: 189 – 191 (1992)) e

encontrado no programa MegAlign<sup>®</sup> v6.1 do software de computação de bioinformática Lasergene (DNASTAR Inc.). Os parâmetros padrão para o alinhamento múltiplo (Penalidade para Espaços = 10, Penalidade para Comprimento = 0,2, Seqs de Atraso Divergen (%) = 30, Peso do DNA de  
5 Transição = 0,5; Matriz de Peso da Proteína = série Gonnet, Matrix do Peso de DNA = IUB). Depois do alinhamento das sequências utilizando o programa Clustal W, é possível obter um “porcental de identidade” visualizando a tabela de “distâncias da sequência” no mesmo programa.

É bem entendido por um técnico no assunto que muitos níveis de  
10 identidade de sequência são úteis na identificação de polipeptídeos, a partir de outras espécies, em que os polipeptídeos possuem a mesma função ou atividade, ou similares. Os exemplos úteis de porcentagem de identidades incluem, mas não são limitados a 24%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95%, ou qualquer porcentagem de  
15 número inteiro de 24% a 100% pode ser útil na descrição da presente invenção, tais como 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%,  
20 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. Os fragmentos de ácidos nucleicos adequados não apenas possuem as homologias acima, mas codificam tipicamente um polipeptídeo que possui pelo menos 50 aminoácidos, de preferência, pelo menos 100 aminoácidos, de maior preferência, pelo menos 150 aminoácidos, de maior preferência ainda, pelo menos 200 aminoácidos, e de maior preferência, ainda, pelo menos 250 aminoácidos.

O termo “software de análise da sequência” se refere a qualquer

algoritmo de computador ou programa de software que é útil para a análise das sequências de nucleotídeos ou aminoácidos. O “software de análise da sequência” pode estar disponível comercialmente ou ser desenvolvido de forma independente. O software típico de análise da sequência inclui, mas não está limitado a: (1) software GCG de programas (Wisconsin Package versão 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), (2) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403 – 410 (1990)), (3) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison, WI), (4) Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI), e (5) o programa FASTA incorporando o algoritmo de Smith-Waterman (W. R. Pearson, *Comput. Methods Genome Res.* [Proc. Int. Symp.] (1994), Data de Reunião 1992, 111 – 20. Editor(es): Suhai, Sandor. Plenum: Nova York, NY). Dentro do contexto do presente pedido, será entendido que, onde o software de análise da sequência é utilizado para a análise, os resultados da análise serão baseados nos “valores default” do programa referenciado, salvo especificado de outra maneira. Conforme utilizado no presente, os “valores default” significam qualquer conjunto de valores ou parâmetros que originalmente carregam com o software, quando primeiro inicializado.

O DNA padrão recombinante e as técnicas de clonagem molecular utilizadas no presente são bem conhecidos no estado da técnica e são descritos por Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) (a seguir “Maniatis”) e por Silhavy, T. J., Bannan, M. L. e Enquist, L. W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984), e por Ausubel, F. M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience (1987). Os métodos complementares utilizados no presente estão em *Methods in Enzymology*, Volume 194, *Guide to Yeast*

*Genetics and Molecular and Cell Biology* (Part A, 2004, Christine Guthrie and Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA).

#### **PRODUÇÃO ATRAVÉS DA ACETOLACTATO A PARTIR DO PIRUVATO ENDÓGENO**

As células de levedura produzem piruvato a partir de açúcares,  
5 que é então utilizado em um número de vias do metabolismo celular, incluindo  
os apresentados na Figura 1. As células de levedura podem ser projetadas  
para produzir uma série de produtos desejáveis, com a etapa inicial da via  
biossintética sendo a conversão do piruvato endógeno em acetolactato. As vias  
biossintéticas projetadas para a síntese do isobutanol (vide a Figura 2) são  
10 descritas no pedido de patente US 2007/0092957 de propriedade comum e co-  
pendente, que é incorporado no presente como referência, e para a síntese do  
2-butanol e 2-butanona (vide Figura 3) estão descritas nos pedidos de patente  
US 2007/0259410 e US 2007/0292927 de propriedade comum e co-pendente,  
que são incorporados no presente como referência. O produto 2,3-butanodiol é  
15 um intermediário na via biossintética descrito no pedido de patente US  
2007/0.292.927. Cada uma dessas vias apresenta a etapa inicial de conversão  
de piruvato a acetolactato pela acetolactato sintase. Portanto, o rendimento do  
produto a partir dessas vias biossintéticas será, em parte, depende da  
quantidade de acetolactato que pode ser produzida a partir do piruvato e da  
20 quantidade de piruvato que está disponível.

Os Depositantes revelaram que através da combinação da  
expressão da atividade enzimática da acetolactato sintase no citosol de  
leveduras possuindo atividade de piruvato descarboxilase reduzida, um fluxo  
surpreendentemente alto de piruvato em acetolactato pode ser obtido. O fluxo  
25 de piruvato em acetolactato pode ser medido pela conversão da glicose ou  
sacarose em 2,3-butanodiol. O piruvato é produzido a partir da glicose ou  
sacarose. A síntese do 2,3-butanodiol requer duas etapas adicionais: a  
conversão de acetolactato em acetoína pela acetolactato descarboxilase, e a

conversão da acetoína em 2,3-butanodiol pela butanodiol desidrogenase. Assim, pelo menos tanto fluxo de piruvato em acetolactato deve ocorrer conforme o fluxo medido a partir de glicose ou sacarose em 2,3-butanodiol e potencialmente mais, uma vez que as duas etapas enzimáticas seguintes ao acetolactato são susceptíveis a serem menos de 100% eficientes.

Os Depositantes revelaram que cerca de 86% do rendimento teórico de conversão da sacarose a 2,3-butanodiol foi realizado na presença de um coletor de elétrons, conforme mostrado no Exemplo 4 deste pedido de patente. Cerca de 90% do rendimento teórico de conversão da glicose a 2,3-butanodiol foi obtido na presença de um coletor de elétrons. O rendimento teórico da glicose para 2,3-butanodiol é calculado em 0,5 g de 2,3-butanodiol por 1 g de glicose. Um coletor eletrônico é necessário para o equilíbrio redox na via biossintética para 2,3-butanodiol. As vias biossintéticas completas do 2-butanol e isobutanol que são descritas nas patentes US 2007/0092957, US 2007/0259410 e US 2007/0292927, são auto redox balanceadas e não necessitam de um coletor de elétron adicional para obter a formação máxima do produto.

A conversão da glicose em 2,3-butanodiol sem um coletor de elétrons adicionados no presente foi encontrado em cerca de 60% do rendimento teórico (0,3 g de 2,3-butanodiol por 1 g de glicose), e a conversão era de cerca de 68% de sacarose. Assim, a conversão de piruvato a acetolactato obtida foi de pelo menos cerca de 60%. Portanto, ao combinar a expressão da atividade enzimática da acetolactato sintase no citosol da levedura com a redução da atividade da piruvato descarboxilase, sem o balanço dos equivalentes redox, a conversão de piruvato a acetolactato pode atingir pelo menos 60% do rendimento teórico. Ao combinar a expressão da atividade enzimática da acetolactato sintase no citosol da levedura com a redução da atividade de piruvato descarboxilase, e com o balanço dos

equivalentes redox, a conversão de piruvato a acetolactato pode alcançar pelo menos cerca de 86% do rendimento teórico.

#### EXPRESSÃO DA ACETOLACTATO SINTASE NO CITOSOL DA LEVEDURA

A acetolactato sintase endógena na levedura é codificada no  
5 genoma mitocondrial e expressa na mitocôndria. Para preparar uma cepa de levedura recombinante da presente invenção, uma modificação genética é realizada que oferece uma expressão citosólica da acetolactato sintase. A acetolactato sintase é expressa a partir do núcleo e nenhum sinal alvo mitocondrial está incluído para que a enzima permaneça no citosol (citosol  
10 localizada).

As enzimas acetolactato sintase, que também podem ser chamadas de acetoidróxi ácido sintase, pertencem à CE 2.2.1.6 (alterada de 4.1.3.18 em 2002), são bem conhecidas, e participam da via biossintética para os aminoácidos proteinogênicos leucina e valina, bem como na via para a  
15 produção fermentativa do 2,3-butanodiol e acetoína em vários organismos.

O técnico no assunto que irá considerar que os polipeptídeos possuindo atividade de acetolactato sintase isolados de uma variedade de fontes serão úteis na presente invenção independente da homologia na sequência. Alguns exemplos de enzimas acetolactato sintase adequadas estão  
20 disponíveis a partir de diversas fontes, conforme descrito nas definições acima. As atividades enzimáticas da acetolactato sintase, que apresenta uma preferência de substrato por piruvato com relação ao cetobutirato são de utilidade particular, tal como as codificadas por alsS de *Bacillus* e budB de *Klebsiella* (Gollop *et al.*, *J. Bacteriol.* 172 (6): 3444 - 3449 (1990); Holtzclaw *et al.*, *J. Bacteriol.* 121 (3): 917 - 922 (1975)).  
25

Porque os acetolactatos sintases são bem conhecidos e devido a prevalência do sequenciamento genômico, os acetolactatos sintases adequados podem ser facilmente identificados por um técnico no assunto, com

base na similaridade de sequência utilizando abordagens de bioinformática. Normalmente o BLAST (descrito acima) em busca de bases de dados disponíveis publicamente, com sequências conhecidas de aminoácidos da acetolactato sintase, tais como as previstas neste pedido de patente, é utilizado para identificar as acetolactatos sintases, e suas sequências de codificação, que podem ser utilizadas nas cepas presentes. Por exemplo, as acetolactatos sintases, que são os 100 vizinhos mais próximos da sequência de *B. subtilis* AlsS são representadas em uma árvore filogenética na Figura 4. As relações de homologia entre as sequências identificadas são mostradas nesta árvore. Entre essas sequências estão aquelas com 40% de identidade, ainda que estas tenham sido verificadas como acetolactato sintase. Uma sequência representativa de cada quadro é dada na Tabela 2. As proteínas acetolactato sintase com pelo menos cerca de 70 - 75%, 75% - 80%, 80 - 85%, 85% - 90%, 90% - 95% ou pelo menos cerca de 98% de identidade sequencial com qualquer uma das proteínas da acetolactato sintase na Tabela 1 (SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18), ou qualquer uma das proteínas da acetolactato sintase representada na Figura 4 pode ser utilizada nas presentes cepas. As identidades estão baseadas no método de alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros padrão da Penalidade para Espaços = 10, Penalidade para Comprimento = 10 e série Gonnet 250 da matriz de peso proteico.

Os exemplos das sequências que codificam a acetolactato sintase, que podem ser utilizadas para fornecer expressão citosólica da atividade da acetolactato sintase, estão listados na Tabela 1 (SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17). As sequências adicionais que codificam a acetolactato sintase, que podem ser utilizadas para a expressão citosólica de levedura, podem ser identificadas na literatura e nas bases de dados da bioinformática bem conhecidas pelos técnicos no assunto, e algumas regiões de codificação para as proteínas als estão representadas na Figura 4 pelo organismo de

origem. Qualquer Als com o número EC 2.2.1.6 pode ser identificado por um técnico no assunto e pode ser utilizado nas presentes cepas.

Além disso, as sequências descritas no presente ou as citadas no estado da técnica podem ser utilizadas para identificar outros homólogos na natureza. Por exemplo, cada acetolactato sintase que codifica os fragmentos de ácidos nucleicos descrita neste pedido de patente pode ser utilizada para isolar os genes que codificam proteínas homólogas. O isolamento de genes homólogos, utilizando os protocolos dependentes da sequência, é bem conhecido no estado da técnica. Os exemplos de protocolos dependentes da sequência incluem, mas não estão limitados a: (1) métodos de hibridização do ácido nucléico; (2) métodos de amplificação do DNA e RNA, conforme exemplificado por vários usos de tecnologias de amplificação dos ácidos nucléicos [por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR), Mullis *et al.*, patente US 4.683.202; reação em cadeia da ligase (LCR), Tabor, S. *et al.*, *Proc. Acad. Sci. USA* 82:1074 (1985); ou amplificação por deslocamento da fita (SDA), Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392 (1992)]; e (3) métodos de construção das bibliotecas e seleção por complementação.

Por exemplo, os genes que codificam proteínas ou polipeptídeos semelhantes aos genes codificadores da acetolactato sintase descritos no presente poderiam ser isolados diretamente utilizando a totalidade ou uma parte dos presentes fragmentos de ácido nucléico como sondas de hibridização de DNA para selecionar bibliotecas a partir de qualquer organismo desejado utilizando uma metodologia bem conhecido pelos técnicos no assunto. As sondas de oligonucleotídeos específicas com base na descrição das sequências de ácidos nucléicos podem ser projetadas e sintetizadas por métodos conhecidos no estado da técnica (Maniatis, acima). Além disso, sequências inteiras podem ser utilizadas diretamente para sintetizar sondas de DNA por métodos conhecidos pelo técnico no assunto (por exemplo, marcação

de DNA *primers* aleatórios, tradução por cortes (*nick translation*) ou técnicas de marcação final), ou as sondas de RNA utilizando sistemas de transcrição *in vitro* disponíveis. Além disso, os *primers* específicos podem ser projetados e utilizados para amplificar uma parte (ou todo o comprimento) das presentes  
5 sequências. Os produtos de amplificação resultantes podem ser marcados diretamente durante as reações de amplificação ou marcados após as reações de amplificação e utilizados como sondas para isolar fragmentos de DNA de comprimento total por hibridação em condições adequadas de rigor.

Normalmente, nas técnicas do tipo PCR, os *primers* apresentam  
10 sequências diferentes e não são complementares entre si. Dependendo das condições do teste, as sequências dos *primers* devem ser concebidas para permitir a replicação eficiente e fiel do ácido nucléico alvo. Os métodos de projeto de *primer* de PCR são comuns e bem conhecidos no estado da técnica (Thein and Wallace, *The use of oligonucleotides as específico hybridization*  
15 *probes in the Diagnosis of Genetic Disorders*, em *Human Genetic Diseases: A Practical Approach*, K. E. Davis Ed., (1986) págs. 33 - 50, IRL: Herndon, VA; and Rychlik, W., em *Methods in Molecular Biology*, White, B. A. Ed., (1993) vol. 15, págs. 31 - 39, *PCR Protocols: Current Methods and Applications*. Humana: Totowa, NJ).

20 Geralmente dois segmentos curtos das sequências descritas podem ser utilizados nos protocolos de reação em cadeia da polimerase para a amplificação de fragmentos de ácidos nucléicos mais longos que codificam genes homólogos do DNA ou RNA. A reação em cadeia da polimerase também pode ser realizada em uma biblioteca de fragmentos de ácidos nucléicos  
25 clonados, em que a sequência de um *primer* é derivada dos fragmentos de ácido nucléico descritos, e a sequência do outro *primer* aproveita a presença da região de ácido poliadenílico na extremidade 3' do precursor de mRNA que codifica os genes microbianos.

Alternativamente, a sequência do segundo *primer* pode estar baseada nas sequências derivadas do vetor de clonagem. Por exemplo, o técnico no assunto pode seguir o protocolo RACE (Frohman *et al.*, PNAS USA 85:8998 (1988)) para gerar cDNAs utilizando PCR para amplificar cópias da região entre um ponto único na transcrição e as extremidades 3' ou 5'. Os *primers* orientados nas direções 3' e 5' podem ser projetados a partir das presentes sequências. Utilizando os sistemas 3' RACE ou 5' RACE disponíveis comercialmente (por exemplo, BRL, Gaithersburg, MD), fragmentos específicos do cDNA 3' ou 5' podem ser isolados (Ohara *et al.*, PNAS USA 86:5673 (1989); Loh *et al.*, *Science* 243:217 (1989)).

Alternativamente, a acetolactato sintase descrita que codifica as sequências pode ser empregada como reagentes de hibridação para a identificação de homólogos. Os componentes básicos de um teste de hibridização do ácido nucléico incluem uma sonda, uma amostra suspeita de conter o gene ou fragmento do gene de interesse e um método de hibridização específico. As sondas são tipicamente sequências de ácidos nucléicos de fita simples que são complementares às sequências de ácido nucléico a serem detectadas. As sondas são "hibridizáveis" à sequência de ácido nucléico a ser detectada. O comprimento da sonda pode variar de 5 bases a dezenas de milhares de bases, e irá depender do teste específico a ser realizado. Normalmente, um comprimento da sonda de cerca de 15 bases a cerca de 30 bases é adequado. Apenas uma parte da molécula da sonda precisa ser complementar à sequência de ácido nucléico a ser detectado. Além disso, a complementaridade entre a sonda e a sequência alvo não precisa ser perfeita. A hibridação ocorre entre moléculas imperfeitamente complementares com o resultado de que uma certa fração de bases na região hibridizada não está pareada com a base complementar adequada.

Os métodos de hibridização são bem definidos. Normalmente, a

sonda e a amostra devem ser misturadas em condições que permitam a hibridização dos ácidos nucleicos. Isto envolve o contato da sonda e da amostra na presença de um sal inorgânico ou orgânico nas condições de concentração e temperatura adequadas. A sonda e os ácidos nucleicos da amostra devem estar em contato por um período longo o suficiente para que qualquer hibridação possível entre a sonda e a amostra de ácido nucleico possa ocorrer. A concentração da sonda ou alvo na mistura irá determinar o tempo necessário para que ocorra a hibridação. Quanto maior a concentração da sonda ou do alvo, menor será o tempo de incubação de hibridação necessário. Opcionalmente, um agente caotrópico podem ser adicionado. O agente caotrópico estabiliza os ácidos nucleicos a inibir a atividade da nuclease. Além disso, o agente caotrópico permite a hibridação sensível e rigorosa das sondas de oligonucleotídeos curtos em temperatura ambiente (Van Ness e Chen, *Nucl. Ácidos Res.* 19: 5143 - 5151 (1991)). Os agentes caotrópicos adequados incluem o cloreto de guanidina, tiocianato de guanidina, tiocianato de sódio, tetracloroacetato de lítio, perclorato de sódio, tetracloroacetato de rubídio, iodeto de potássio e trifluoroacetato de cézio, entre outros. Normalmente, o agente caotrópico estará presente em uma concentração final de cerca de 3 M. Se desejar, pode-se acrescentar formamida à mistura de hibridização, normalmente de 30 a 50% (v/v).

Várias soluções de hibridização podem ser empregadas. Normalmente, estas compreendem entre cerca de 20 - 60% em volume, de preferência, 30% de um solvente orgânico polar. Uma solução de hibridização comum emprega cerca de 30 a 50% v/v de formamida, cerca de 0,15 a 1 M de cloreto de sódio, cerca de 0,05 a 0,1 M de tampões (por exemplo, citrato de sódio, Tris-HCl, PIPES ou HEPES (pH varia de cerca de 6 a 9)), cerca de 0,05 a 0,2% de detergente (por exemplo, dodecilsulfato de sódio), ou entre 0,5 e 20 mM de EDTA, FICOLL (Pharmacia Inc.) (cerca de 300 a 500 kdal),

polivinilpirrolidona (cerca de 250 a 500 kdal) e albumina. Também estão incluídos na solução de hibridização típica os ácidos nucléicos transportadores não marcados de cerca de 0,1 a 5 mg/mL, DNA nucléico fragmentado (por exemplo, timo de bezerro ou DNA do esperma de salmão, ou RNA de levedura) e, opcionalmente, cerca de 0,5 a 2% em peso/vol de glicina. Outros aditivos também podem ser incluídos, tais como os agentes de exclusão por volume que incluem uma variedade de agentes polares hidrossolúveis ou expansíveis (por exemplo, polietilenoglicol), polímeros aniônicos (por exemplo, poliacrilato polimetilacrilato) e polímeros aniônicos sacarídicos (por exemplo, sulfato de dextrano).

A hibridização dos ácidos nucléicos é adaptável a uma variedade de formatos de teste. Um dos mais adequados é o formato de teste do tipo sanduíche. O teste do tipo sanduíche é particularmente adaptável para a hibridação em condições não desnaturantes. Um componente principal de um teste tipo sanduíche é um suporte sólido. O suporte sólido tem a ele adsorvido ou covalentemente acoplado uma sonda de ácido nucléico imobilizada que é não marcada e complementar a uma porção da sequência.

A expressão citosólica do acetolactato sintase é possível pela transformação com um gene que compreende uma sequência que codifica uma proteína de acetolactato sintase, sem a sequência de sinalização do alvo mitocondrial. Os métodos de expressão gênica em leveduras são conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, em *Methods in Enzymology*, volume 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology* (parte A, 2004, Christine Guthrie and Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA). A expressão de genes em levedura normalmente exige um promotor, operavelmente ligado a uma região de codificação de interesse e um terminador da transcrição. Um número de promotores de levedura pode ser utilizado na construção de cassetes de expressão para genes que codificam

uma acetolactato sintase, incluindo, mas não limitados aos promotores constitutivos FBA, GPD1, ADH1 e GPM, e os promotores induzíveis GAL1, GAL10 e CUP1. Os terminadores transcricionais adequados incluem, mas não estão limitados a, FBA<sub>t</sub>, GPD<sub>t</sub>, GPM<sub>t</sub>, ERG10<sub>t</sub>, GAL1<sub>t</sub>, CYC1 e ADH1.

5 Os promotores adequados, terminadores transcricionais e as regiões de codificação do acetolactato sintase apropriados podem ser clonados em vetores de transporte de *E. coli* - levedura, e transformados em células de levedura, conforme descrito nos Exemplos 2 - 4. Estes vetores permitem a propagação da cepa em ambas as cepas de *E. coli* e leveduras. Normalmente, o vetor contém um marcador selecionável e sequências que permitem uma  
10 replicação autônoma ou integração cromossômica no hospedeiro desejado. Os plasmídeos normalmente utilizados em leveduras são vetores de transporte pRS423, pRS424, pRS425 e pRS426 (American Type Culture Collection, Rockville, MD), que contêm uma origem de replicação em *E. coli* (por exemplo, pMB1), uma origem de replicação 2 $\mu$ de levedura e um marcador para a  
15 seleção nutricional. Os marcadores de seleção para esses quatro vetores são His3 (vetor pRS423), Trp1 (vetor pRS424), leu2 (vetor pRS425) e URA3 (vetor pRS426). A construção dos vetores de expressão com um gene quimérico que codifica um acetolactato sintase pode ser realizada por técnicas de clonagem  
20 molecular padrão em *E. coli* ou pelo método de recombinação de reparo do intervalo em levedura.

A abordagem de clonagem no reparo do intervalo aproveita a recombinação homóloga altamente eficiente em levedura. Normalmente, um DNA do vetor de levedura é digerido (por exemplo, no seu sítio de clonagem  
25 múltiplo) para criar um "intervalo" em sua sequência. Uma série de DNAs de inserção de interesse é gerada contendo uma sequência de pb  $\geq$  21, tanto nas extremidade 5' e na 3', que sequencialmente sobrepõem uns aos outros, e com o terminal 5' e 3' do DNA do vetor. Por exemplo, para construir um vetor de

expressão de levedura para “Gene X”, um promotor de levedura e um terminador de levedura são selecionados para o cassete de expressão. O promotor e o terminador são amplificados a partir do DNA genômico de levedura, e o Gene X é amplificado por PCR a partir do seu organismo de  
5 origem ou obtido a partir de um vetor de clonagem que compreende a sequência do Gene X. Há pelo menos uns 21 pb sobrepondo a sequência entre a extremidade 5’ do vetor linearizado e a sequência do promotor, entre o promotor e o Gene X, entre o Gene X e uma sequência terminadora, e entre o terminador e a extremidade 3’ do vetor linearizado. O vetor “com intervalo” e os  
10 DNAs inseridos são, então, co-transformados em uma cepa de levedura e plaqueados no meio contendo misturas de compostos adequados que permitem a complementação dos marcadores de seleção nutricionais sobre os plasmídeos. A presença de combinações de inserção corretas pode ser confirmada pelo mapeamento por PCR utilizando o DNA plasmidial preparado  
15 a partir das células selecionadas. O DNA plasmidial isolado de leveduras (geralmente em baixa concentração) pode ser, então, transformado em uma cepa de *E. coli*, por exemplo, *TOP10*, seguido por mini preparações e mapeamento de restrição para verificar a construção do plasmídeo. Finalmente, a construção pode ser verificada pela análise da sequência.

20 Assim como a técnica de reparo do intervalo, a integração no genoma da levedura também aproveita o sistema de recombinação homóloga na levedura. Normalmente, um cassete contendo uma região de codificação mais os elementos de controle (promotor e terminador) e marcadores auxotróficos é amplificado por PCR com uma DNA polimerase de alta  
25 fidelidade utilizando *primers* que hibridizam ao cassete e contém de 40 a 70 pares de bases de homologia de sequência com as regiões 5’ e 3’ da área genômica onde a inserção é desejada. O produto da PCR é então transformado na levedura e plaqueado em um meio contendo misturas de

compostos apropriados que permitem a seleção do marcador auxotrófico integrado. Por exemplo, para integrar o “Gene X” na localização cromossômica “Y”, a construção terminadora da região X que codifica o promotor é amplificada por PCR a partir de uma construção de DNA plasmidial e unida a um marcador autotrófico (tal como o *URA3*) por SOE PCR ou por digestões enzimáticas comuns e clonagem. O cassete completo, contendo a região X – terminadora –*URA3* que codifica o promotor é amplificada por PCR com as sequências de *primers* que contêm 40 a 70 bp de homologia nas regiões 5’ e 3’ do local “Y” no cromossomo da levedura. O produto da PCR é transformado em leveduras e selecionado nos meios de cultura sem uracila. Os transformadores podem ser verificados por PCR da colônia ou por sequenciamento direto do DNA cromossômico.

#### ATIVIDADE DA PIRUVATO DESCARBOXILASE REDUZIDA

A atividade endógena da piruvato descarboxilase em levedura converte o piruvato em acetaldeído, que é então convertido a etanol ou a acetil-CoA via acetato (vide Figura 1). As leveduras podem apresentar um ou mais genes que codificam a piruvato descarboxilase. Por exemplo, há um gene que codifica a piruvato descarboxilase em *Kluyveromyces lactis*, enquanto que há três isoenzimas de piruvato descarboxilase codificadas pelos genes *PDC1*, *PDC5* e *PDC6* em *Saccharomyces cerevisiae*, bem como um gene *PDC2* regulador da piruvato descarboxilase. A expressão da piruvato descarboxilase a partir do *PDC6* é mínima. Nas cepas de leveduras presentes, a atividade piruvato descarboxilase é reduzida pela interrupção de pelo menos um gene que codifica uma piruvato descarboxilase, ou um gene de regulação da expressão gênica do piruvato descarboxilase. Por exemplo, em *S. cerevisiae*, os genes *PDC1* e *PDC5*, ou todos os três genes, são interrompidos. Além disso, a atividade da piruvato descarboxilase pode ser reduzida pela interrupção do gene regulatório *PDC2* em *S. cerevisiae*. Em outras leveduras,

os genes que codificam as proteínas piruvato descarboxilase, tais como aqueles que possuem pelo menos cerca de 80 - 85%, 85% - 90%, 90% - 95%, ou pelo menos cerca de 98% de identidade sequencial com *PDC1* ou *PDC5* podem ser interrompidos.

5 Os exemplos de cepas de leveduras com atividade reduzida de piruvato descarboxilase devido ao interrupção dos genes que codificam a piruvato descarboxilase têm sido relatados, tal como a *Saccharomyces* em Flikweert *et al.*, (*Yeast* (1996) 12: 247-257), a *Kluyveromyces* em Bianchi *et al.*, (*Mol. Microbiol.* (1996) 19 (1): 27-36) e a interrupção do gene regulador em  
10 Hohmann (*Mol. Gen. Genet.*, (1993) 241: 657-666). As cepas de *Saccharomyces* sem nenhuma atividade de piruvato descarboxilase estão disponíveis pela ATCC com N° de Acesso 200027 e 200028.

A expressão dos genes piruvato descarboxilase pode ser reduzida em qualquer cepa de levedura que também é projetada com a expressão  
15 citosólica da acetolactato sintase e outros genes que codificam as enzimas da via biossintética para a produção de um composto derivado do acetolactato. Os exemplos de genes de piruvato descarboxilase da levedura que podem ser alvo para a interrupção estão listados na Tabela 2 (SEQ ID Nos.: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66). Outros genes alvos, tais como aqueles que codificam as  
20 proteínas da piruvato descarboxilase com pelo menos cerca de 80 - 85%, 85% - 90%, 90% - 95%, ou pelo menos cerca de 98% de identidade sequencial com o piruvato descarboxilase listado na Tabela 2 (SEQ ID Nos.: 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67), podem ser identificados na literatura e em bancos de dados de bioinformática bem conhecidos pelo técnico no assunto. Além disso, as  
25 sequências descritas no presente ou citadas no estado da técnica podem ser utilizadas para identificar os homólogos em outras cepas de leveduras, conforme descrito acima para a identificação dos genes que codificam a acetolactato sintase.

Como alternativa, pelo fato das sequências que codificam a piruvato descarboxilase serem bem conhecidas e pelo fato do sequenciamento dos genomas de leveduras ser prevalente, os genes alvos adequados da piruvato descarboxilase podem ser identificados com base na similaridade da  
5 sequência utilizando o acesso da bioinformática. Os genomas foram completamente sequenciados e anotados e estão publicamente disponíveis para as seguintes cepas de leveduras: *Ashbya gossypii* ATCC 10895, *Candida glabrata* CBS 138, *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140, *Pichia stipitis* CBS 6054, *Saccharomyces cerevisiae* S288c, *Schizosaccharomyces pombe* 972h- e  
10 *Yarrowia lipolytica* CLIB122. Tipicamente o BLAST (descrito acima) em busca de bases de dados disponíveis publicamente com sequências conhecidas que codificam a piruvato descarboxilase ou sequências de aminoácidos da piruvato descarboxilase, tais como as previstas no presente, é utilizado para identificar as sequências de codificação da piruvato descarboxilase de outras leveduras.

15 Assim sendo, está no escopo da presente invenção fornecer proteínas de piruvato descarboxilase com pelo menos cerca de 70 - 75%, 75% - 80%, 80 - 85%, 85% - 90%, 90% - 95% ou pelo menos cerca de 98% de identidade sequencial para qualquer proteína de piruvato descarboxilase descrita no presente (SEQ ID No. 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65 e 67). As  
20 identidades estão baseadas no método de alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros padrão de GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e uma série Gonnet 250 de matriz de peso proteico.

Os genes que codificam o piruvato descarboxilase podem ser interrompidos em qualquer célula de levedura com modificação genética.  
25 Muitos métodos para a modificação genética de genes alvo são conhecidos pelos técnicos no assunto e podem ser utilizados para criar as presentes cepas de leveduras. As modificações que podem ser utilizadas para reduzir ou eliminar a expressão de uma proteína alvo são as interrupções que incluem,

mas não estão limitados a deleção de todo gene ou uma parte do gene que codifica um piruvato descarboxilase, a inserção de um fragmento de DNA em um gene que codifica o piruvato descarboxilase (no promotor ou na região de codificação), de modo que a proteína não é expressa ou expressa em níveis  
5 mais baixos, a introdução de uma mutação em uma região de codificação da piruvato descarboxilase, que acrescenta um códon de parada ou mudança de quadro de tal forma que uma proteína funcional não é expressa, e a introdução de uma ou mais mutações em uma região de codificação da piruvato descarboxilase para alterar os aminoácidos de forma que uma proteína não-  
10 funcional ou menos enzimaticamente ativa seja expressa. Além disso, a expressão de um gene de piruvato descarboxilase pode ser bloqueada pela expressão de um RNA antisense ou um RNA de interferência, e as construções podem ser introduzidas resultando na cossupressão. Além disso, um gene que codifica a piruvato descarboxilase pode ser sintetizado, cuja expressão é baixa  
15 uma vez que os códons raros são substituídos por outros abundantes, e este gene substituído pelo gene que codifica a piruvato descarboxilase endógena correspondente. Tal gene irá produzir o mesmo polipeptídeo, mas em uma taxa inferior. Além disso, a síntese ou a estabilidade da transcrição pode ser reduzida por mutação. Da mesma forma, a eficiência pela qual a proteína é  
20 traduzida do mRNA pode ser modulada por mutação. Todos esses métodos podem ser facilmente praticados por um técnico no assunto utilizando as sequências conhecidas ou identificadas que codificam as proteínas de piruvato descarboxilase.

As sequências de DNA em torno de uma sequência de  
25 codificação da piruvato descarboxilase também são úteis em alguns procedimentos de modificação e estão disponíveis para as leveduras, tais como pela *Saccharomyces cerevisiae* na sequência completa do genoma coordenado pelo Projeto Genoma ID9518 do Projeto Genoma coordenado pelo

NCBI (National Center for Biotechnology Information), com identificação GOPID 13838. Outros exemplos de sequências genômicas de levedura incluem o da *Yarrowia lipolytica*, GOPIC 13837 e da *Candida albicans*, que está incluído no GPID 10771, 10701 e 16373. Outras sequências genômicas de levedura  
5 podem ser facilmente encontradas por um técnico no assunto nas bases de dados disponíveis publicamente.

Em particular, as sequências de DNA em torno de uma sequência de codificação da piruvato descarboxilase são úteis para a modificação dos métodos utilizando a recombinação homóloga. Por exemplo, neste método, as  
10 sequências flanqueadoras do gene piruvato descarboxilase são colocadas ligando um gene marcador selecionável para mediar a recombinação homóloga em que o gene marcador substitui o gene da piruvato descarboxilase. Do mesmo modo, as sequências parciais do gene da piruvato descarboxilase e as sequências que flanqueiam o gene da piruvato descarboxilase, que se liga a  
15 um gene marcador selecionável, podem ser utilizadas para mediar a recombinação homóloga em que o gene marcador substitui uma parte do gene alvo da piruvato descarboxilase. Além disso, o marcador selecionável pode ser ligado pelos sítios de recombinação sítio específico, de modo que, após a expressão da recombinase sítio específico correspondente, o gene de  
20 resistência é extirpado do gene da piruvato descarboxilase sem reativar o último. A recombinação sítio-específica deixa para trás um sítio de recombinação que interrompe a expressão da proteína piruvato descarboxilase. O vetor de recombinação homólogo pode ser construído para também deixar uma deleção no gene da piruvato descarboxilase após a excisão do marcador  
25 selecionável, conforme é bem conhecido por um técnico no assunto.

As deleções poderão ser realizadas utilizando a recombinação mitótica, conforme descrito por Wach *et al.*, ((1994) *Yeast* 10: 1793 - 1808). Este método envolve a preparação de um fragmento de DNA que contém um

marcador selecionável entre as regiões genômicas que pode ser tão curto quanto 20 pb e que se liga a uma sequência de DNA alvo. Este fragmento de DNA pode ser preparado através da amplificação por PCR do gene marcador selecionável utilizando como *primers* os oligonucleotídeos que hibridizam com as extremidades do gene marcador e que incluem as regiões genômicas que podem se recombinar com o genoma da levedura. O fragmento de DNA linear pode ser eficientemente transformado em levedura e recombinado no genoma, resultando na substituição de genes, incluindo a deleção da sequência do DNA alvo (conforme descrito em *Methods in Enzymology*, vol. 194, pág. 281 - 301 (1991)).

Além disso, os métodos de substituição do promotor podem ser utilizados para trocar os elementos de controle transcricional endógenos permitindo que outros meios modulem a expressão, tal conforme descrito em Mnaimneh *et al.*, ((2004) *Cell* 118 (1): 31 - 44) e no Exemplo 12 do presente.

Além disso, a atividade da piruvato descarboxilase em qualquer célula de levedura pode ser interrompida utilizando a mutagênese aleatória, que é seguida pela triagem para identificar as cepas com atividade reduzida de piruvato descarboxilase. Utilizando esse tipo de método, a sequência de DNA da região de codificação da piruvato descarboxilase, ou qualquer outra região do genoma que afete a expressão da atividade da piruvato carboxilase, não precisa ser conhecida.

Os métodos para criar mutações genéticas são comuns e bem conhecidos no estado da técnica e podem ser aplicados para o exercício da criação de mutantes. Os métodos de modificação genética aleatórios comumente utilizados (revisados em *Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) incluem a mutagênese espontânea, mutagênese causada por genes causadores de mutação, mutagênese químicos, irradiação com UV ou raios-X, ou mutagênese

por transposon.

A mutagênese química da levedura comumente envolve o tratamento de células de levedura com um dos seguintes agentes mutagênicos de DNA: metanossulfonato de etila (EMS), ácido nítrico, sulfato de dietila ou N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (MNNG). Estes métodos de mutagênese foram revistos por Spencer *et al.*, (*Mutagenesis in Yeast*, 1996, *Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ). A mutagênese química com EMS pode ser realizada conforme descrito em *Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. A irradiação com luz ultravioleta (UV) ou raios-X também pode ser utilizada para produzir a mutagênese aleatória em células de levedura. O principal efeito da mutagênese por irradiação UV é a formação de dímeros de pirimidina que interrompem a fidelidade da replicação do DNA. Os protocolos para a mutagênese por UV de levedura pode ser encontrado em Spencer *et al.*, (*Mutagenesis in Yeast*, 1996, *Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology*. Humana Press, Fairfield, NJ). A introdução de um fenótipo mutante também pode ser utilizada para gerar mutações cromossômicas aleatórias em leveduras. Os fenótipos de agentes mutantes comuns podem ser obtidos através da interrupção de um ou mais dos seguintes genes: *PMS1*, *MAG1*, *RAD18* ou *RAD51*. A restauração do fenótipo não mutante pode ser facilmente obtida pela inserção do alelo do tipo selvagem. As coleções de células modificadas, produzidas a partir de qualquer um destes ou outros processos conhecidos de mutagênese aleatória, podem ser selecionadas para a atividade reduzida da piruvato descarboxilase.

25

#### REDUÇÃO NA ATIVIDADE DA PIRUVATO DESIDROGENASE

A atividade endógena da piruvato desidrogenase na mitocôndria está na mitocôndria da levedura e catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato para formar a acetil-CoA. A acetil-CoA é utilizada no ciclo do TCA e na

biossíntese de ácidos graxos. A enzima piruvato desidrogenase é uma enzima de um complexo multienzimático da piruvato desidrogenase. O próprio piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1) contem subunidades alfa e beta: *PDA1* e *PDB1*, respectivamente, formando o componente E1. O complexo inclui um núcleo E2, 5 que apresenta atividade de diidrolipoamida acetiltransferase (EC 2.3.1.12) e E3 que apresenta atividade de diidrolipoamida desidrogenase (EC 1.8.1.4). A E2 pode ser codificada por *lat1* e E3 por *lpd1*. Um complexo de proteína adicional é codificado por *pdx1*. Assim, o complexo piruvato desidrogenase pode incluir PDA1, PDB1, Lat1, Lpd1 e Pdx1, ou proteínas homólogas codificadas pelos 10 genes que podem ter nomes alternativos em diversas leveduras.

Qualquer um dos genes que codificam as enzimas do complexo piruvato desidrogenase da levedura pode ser interrompido para reduzir a atividade da piruvato desidrogenase em uma célula de levedura para preparar uma cepa de uma realização da presente invenção. Os exemplos de genes que 15 codificam as proteínas do complexo piruvato desidrogenase da levedura que podem ser alvo de interrupção são apresentados na Tabela 2 (SEQ ID Nos.: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100). Outros genes alvo, tais como aqueles que codificam as proteínas de piruvato desidrogenase com pelo menos cerca de 80 - 85%, 85% - 90%, 90% - 95%, ou pelo menos cerca de 98% de 20 identidade sequencial com o piruvato desidrogenase listados na Tabela 2 (SEQ ID Nos: 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101) podem ser identificados na literatura e nos bancos de dados de bioinformática conhecidos pelo técnico no assunto conforme descrito acima. Além disso, as sequências descritas no presente ou aquelas citadas no estado da técnica podem ser utilizadas para 25 identificar outros homólogos na natureza, conforme descrito acima para as sequências de codificação da acetolactato sintase.

Assim sendo, está no escopo da presente invenção fornecer proteínas complexas de piruvato desidrogenase com pelo menos cerca de 70 -

75%, 75% - 80%, 80 - 85%, 85% - 90%, 90% - 95% ou pelo menos cerca de 98% de identidade sequencial com qualquer uma das proteínas do complexo piruvato desidrogenase descrito no presente (SEQ ID No. 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101). As identidades estão baseadas no método de alinhamento  
5 Clustal W utilizando os parâmetros padrão de GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e séries Gonnet 250 de matriz de peso proteico.

Os genes que codificam proteínas do complexo piruvato desidrogenase podem ser interrompidos em qualquer célula de levedura utilizando a modificação genética. Muitos métodos para a modificação genética  
10 dos genes alvo são conhecidos por um técnico no assunto e podem ser utilizados para criar as presentes cepas de leveduras. Os exemplos de métodos que podem ser utilizados são os descritos acima para a interrupção dos genes que codificam o piruvato descarboxilase. Além disso, a atividade da piruvato desidrogenase em qualquer célula de levedura pode ser interrompida  
15 utilizando a mutagênese aleatória, que é seguida pela triagem para identificar as cepas com a atividade reduzida de piruvato desidrogenase. Utilizando esse tipo de método, a sequência de DNA da região de codificação da piruvato desidrogenase, ou qualquer outra região do genoma que afeta a expressão da atividade da piruvato desidrogenase, não precisa ser conhecida. Os exemplos  
20 de métodos são conforme descrito acima para a mutagênese aleatória da piruvato descarboxilase.

#### **ATIVIDADE REDUZIDA DA GLICEROL-3-FOSFATO DESIDROGENASE**

A glicerol-3-fosfato desidrogenase endógena dependente de NAD é uma enzima chave na síntese de glicerol, convertendo a dihidroxiacetona  
25 fosfato (DHAP) em glicerol-3-fosfato, desempenhando um papel importante na oxidação celular do NADH. Cepas de levedura podem ter um ou mais genes que codificam a glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD) dependente de NAD. Em algumas leveduras, tal como a *S. cerevisiae*, *S. pombe* e *P. stipitis*, a GPD1

e GPD2 são homólogos funcionais para a glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD. Qualquer um dos genes que codificam as enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD de levedura pode ser interrompido para reduzir a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD em uma célula de levedura para preparar uma cepa de uma realização da presente invenção.

Os exemplos de regiões de codificação de genes que codificam a proteína glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD de levedura, que podem ser alvo de interrupção, são apresentados na Tabela 2 (SEQ ID Nos.: 68, 70, 72, 74, 76, 80). Outros genes alvo, tais como aqueles que codificam as proteínas glicerol-3-fosfato desidrogenase dependentes de NAD com pelo menos cerca de 80 - 85%, 85% - 90%, 90% - 95%, ou pelo menos cerca de 98% de identidade sequencial com a glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD, listada na Tabela 2, (SEQ ID Nos: 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81) podem ser identificados na literatura e em bancos de dados de bioinformática bem conhecidos pelo técnico no assunto. Além disso, as sequências descritas no presente ou citadas no estado da técnica podem ser utilizadas para identificar outros homólogos na natureza, conforme descrito acima para as sequências de codificação do acetolactato sintase.

Assim sendo, está no escopo da presente invenção fornecer as proteínas glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD com pelo menos cerca de 70 - 75%, 75% - 80%, 80 - 85%, 85% - 90%, 90% - 95% ou pelo menos cerca de 98% de identidade sequencial com qualquer uma das proteínas glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD descritas no presente (SEQ ID No. 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81). As identidades estão baseadas no método de alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros padrão de GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e as séries Gonnet 250 de matriz de peso proteico.

Os genes que codificam as glicerol-3-fosfato desidrogenases dependentes de NAD podem ser interrompidos em qualquer célula de levedura utilizando a modificação genética. Muitos métodos para a modificação genética de genes alvo são conhecidos por um técnico no assunto e podem ser  
5 utilizados para criar as cepas de leveduras presentes.

Além disso, a mutagênese aleatória e a seleção podem ser utilizadas para interromper a expressão da glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD. Os exemplos de modificação genética e métodos de mutagênese aleatória que pode ser utilizados estão descritos acima para a  
10 interrupção dos genes que codificam o piruvato descarboxilase.

#### CÉLULAS DE LEVEDURA COM CONVERSÃO APRIMORADA DE PIRUVATO PARA ACETOLACTATO

As características das cepas de leveduras descritas neste pedido de patente podem ser realizadas em qualquer série da levedura que  
15 é passível de manipulação genética. Os exemplos incluem leveduras *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Yarrowia*. As cepas adequadas incluem, mas não estão limitadas a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *stipitis Pichia* e *Yarrowia lipolytica*. A mais  
20 adequada é a *Saccharomyces cerevisiae*.

Para a produção máxima de alguns produtos, tais como 2,3-butanodiol, isobutanol, 2-butanona ou 2-butanol, as cepas de leveduras utilizadas como hospedeiros de produção, de preferência, apresentam  
25 uma maior tolerância à substância química produzida e tem uma elevada taxa de utilização de carboidratos. Essas características podem ser atribuídas à mutagênese e seleção, à engenharia genética ou podem ser naturais.

**BIOSSÍNTESE DE PRODUTOS NA CEPA DE CONVERSÃO APRIMORADA DE PIRUVATO  
PARA ACETOLACTATO**

Qualquer produto que tenha acetolactato como um intermediário da via pode ser produzido com uma maior eficácia em uma cepa de levedura descrita no presente, com melhor conversão de piruvato a acetolactato. Uma  
5 lista de tais produtos inclui, mas não está limitada a, valina, leucina, álcool isoamílico, 2,3-butanodiol, 2-butanona, 2-butanol e isobutanol.

A biossíntese da valina inclui as etapas de conversão do acetolactato em 2,3-diidroxi-isovalerato pela redutoisomerase acetidróxiácido  
10 (ILV5), conversão do 2,3-diidroxi-isovalerato em 2-ceto-isovalerato pela diidroxi ácido desidratase (ILV3) e conversão do 2-ceto-isovalerato em valina pelo aminoácido transaminase de cadeia ramificada (BAT2) e aminoácido aminotransferase de cadeia ramificada (BAT1). A biossíntese da leucina inclui as mesmas etapas para o 2-ceto-isovalerato, seguidas pela conversão do 2-  
15 ceto-isovalerato em  $\alpha$ -isopropilmalato pela  $\alpha$ -isopropilmalato sintase (LEU9, LEU4), a conversão da  $\alpha$ -isopropilmalato em  $\beta$ -isopropilmalato pela isopropilmalato isomerase (LEU1), a conversão da  $\beta$ -isopropilmalato em  $\alpha$ -cetoisocaproato pela  $\beta$ -IPM desidrogenase (LEU2) e, finalmente, a conversão da  $\alpha$ -cetoisocaproato em leucina pelo aminoácido transaminase de cadeia  
20 ramificada (BAT2) e o aminoácido aminotransferase de cadeia ramificada (BAT1). A maior conversão de piruvato a acetolactato irá aumentar o fluxo dessas vias, especialmente se uma ou mais enzimas da via for superexpressa para puxar o acetolactato para dentro da via. Assim, é desejável a produção da valina ou leucina para a superexpressão de pelo menos uma das enzimas  
25 nestas vias descritas.

A biossíntese do álcool isoamílico inclui as etapas de conversão de leucina em  $\alpha$ -cetoisocaproato por aminoácido transaminase de cadeia ramificada (BAT2) e aminoácido aminotransferase de cadeia ramificada

(BAT1), a conversão da  $\alpha$ -cetoisocaproato em 3-metilbutanal pela cetoisocaproato descarboxilase (THI3) ou ARO10 descarboxilase e, finalmente, a conversão da 3-metilbutanal em álcool isoamílico por uma álcool desidrogenase, tal como a ADH1 ou SFA1. Portanto, a produção adicional do  
5 álcool isoamílico se beneficia do aumento da produção do intermediário de leucina ou de  $\alpha$ -cetoisocaproato pela superexpressão de uma ou mais enzimas nas vias biossintéticas para esses produtos químicos. Além disso, uma ou ambas as enzimas para as duas últimas etapas podem ser superexpressas.

As vias biossintéticas que começam com uma etapa de conversão  
10 do piruvato a acetolactato para a síntese de isobutanol estão descritas no pedido de patente US 2007/0092957 A1 de propriedade comum e co-pendente, que é incorporado no presente como referência. Um diagrama das vias biossintéticas do isobutanol descrito é fornecido na Figura 2. A produção do isobutanol em uma cepa descrita no presente se beneficia da crescente  
15 disponibilidade de acetolactato. Conforme descrito no pedido de patente US 2007/0.092.957 A1, as etapas em um exemplo da via biossintética do isobutanol utilizando acetolactato incluem a conversão de:

- acetolactato em 2,3-diidroxiisovalerato (Fig. 2, via da etapa b), catalisada, por exemplo, pelo acetoidróxi ácido isomeroreductase;
- 20 - 2,3-diidroxiisovalerato em  $\alpha$ -cetoisovalerato (Fig. 2, via da etapa c) tal como, por exemplo, catalisada pelo acetoidróxi ácido desidratase;
- $\alpha$ -cetoisovalerato em isobutiraldeído (Fig. 2, via da etapa d), catalisada, por exemplo, pela  $\alpha$ -ceto ácido descarboxilase de cadeia ramificada; e
- 25 - isobutiraldeído em isobutanol (Fig. 2, via da etapa e) catalisada, por exemplo, pelo álcool desidrogenase de cadeia ramificada.

Os genes que podem ser utilizados para a expressão destas enzimas, bem como aqueles para duas vias do isobutanol adicionais, estão

descritos no pedido de patente US 2007/0.092.957 A1, e os genes adicionais que podem ser utilizados podem ser identificados por um técnico no assunto. O uso preferencial em todas as três vias das enzimas cetol-ácido redutoisomerase (KARI) com atividades especialmente elevadas é descrito na  
5 patente US 2008/0261230 de propriedade comum e co-pendente. Os exemplos da alta atividade de KARIs descritos são aqueles da *Vibrio cholerae* (DNA: SEQ ID No. 39; proteína SEQ ID No. 40), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (DNA: SEQ ID No. 41; proteína SEQ ID No. 42) e *Pseudomonas fluorescens* PF5 (DNA: SEQ ID No. 43; proteína SEQ ID No. 44).

10 Útil para a última etapa da conversão do isobutiraldeído em isobutanol é uma nova butanol desidrogenase isolada a partir de um isolado ambiental de uma bactéria identificada como *Achromobacter xylosoxidans* que é descrita na patente US 12/430356 de propriedade comum e co-pendente (DNA: SEQ ID No. 35, proteína SEQ ID No. 36).

15 Adicionalmente descrito no pedido de patente US 2007/0.092.957 A1 está a construção de genes quiméricos e da levedura de engenharia genética, exemplificado pela *Saccharomyces cerevisiae* para a produção do isobutanol utilizando as vias biossintéticas descritas.

20 As vias biossintéticas que iniciam com uma etapa de conversão do piruvato a acetolactato para a síntese da 2-butanona e do 2-butanol são descritas nas patentes US 2007/0259410 A1 e US 2007/0292927 A1 de propriedade comum e co-pendente, que são incorporados no presente como referência. Um diagrama das vias biossintéticas da 2-butanona e do 2-butanol descritos é fornecido na Figura 3. A 2-butanona é o produto produzido quando  
25 a última etapa descrita de conversão da 2-butanona em 2-butanol é omitida. A produção da 2-butanona ou 2-butanol em uma cepa descrita no presente se beneficia do aumento da disponibilidade de acetolactato. Conforme descrito na patente US 2007/0292927 A1, as etapas em uma via biossintética de exemplo

utilizando o acetolactato incluem a conversão de:

- acetolactato em acetoína (Fig. 3, etapa b) catalisada, por exemplo, pela acetolactato descarboxilase;

5 - acetoína em 2,3-butanodiol (Fig. 3, etapa i) catalisada, por exemplo, pela butanodiol desidrogenase;

- 2,3-butanodiol em 2-butanona (Fig. 3, etapa j) catalisada, por exemplo, pela desidratase diol ou glicerol desidratase, e

- 2-butanona em 2-butanol (Fig. 3, etapa f) catalisada, por exemplo, pela butanol desidrogenase.

10 Os genes que podem ser utilizados para a expressão dessas enzimas estão descritos no pedido de patente US 2007/0.292.927 A1. A utilização desta via na levedura da butanodiol desidratase pela *Roseburia inulinivorans*, RdhtA, (proteína SEQ ID No. 32, região de codificação SEQ ID No. 31) é descrita no pedido de patente US 12/111359 de propriedade comum  
15 e co-pendente. Esta enzima é utilizada em conjunto com a butanodiol desidratase reativase pela *Roseburia inulinivorans*, RdhtB, (proteína SEQ ID No. 34, região de codificação SEQ ID No. 33). Este butanodiol desidratase é desejado em muitos hospedeiros, pois não requer coenzima B<sub>12</sub>.

Útil para a última etapa de conversão da 2-butanona em 2-butanol  
20 está uma nova butanol desidrogenase isolada de uma bactéria identificada como *Achromobacter xylosoxidans* que é descrita no pedido de patente US 12/430356 de propriedade comum e co-pendente (DNA: SEQ ID No. 35, proteína SEQ ID No. 36).

Adicionalmente descrito no pedido de patente US 12/111359 está  
25 a construção de genes quiméricos e engenharia genética de leveduras para a produção do 2-butanol utilizando a via biossintética descrita no pedido de patente US 2007/0.292.927 A1. O 2,3-butanodiol é um intermediário nesta via do 2-butanol e as etapas em sua síntese também são descritas acima.

### MEIOS DE FERMENTAÇÃO

As leveduras descritas no presente podem ser cultivadas nos meios de fermentação para a produção de um produto com acetolactato como intermediário. Os meios de fermentação devem conter substratos de carbono apropriados. Os substratos adequados podem incluir, mas não estão limitados a monossacarídeos, tais como a glicose e a frutose, oligossacarídeos, tais como a lactose ou sacarose, polissacarídeos, tais como o amido ou a celulose ou as misturas dos mesmos e misturas não purificadas de matérias-primas renováveis, tal como o permeado de soro de queijo, água de maceração do milho, melaço da beterraba sacarina, malte de cevada. Além disso, o substrato de carbono também pode ser um substrato de um carbono, tal como o dióxido de carbono, ou metanol, para o qual a conversão metabólica em intermediários bioquímicos fundamentais tem sido demonstrada. Além de um e dois substratos de carbono, os organismos metilotróficos são também conhecidos por utilizar uma série de outros compostos de carbono, tal como a metilamina, glucosamina e uma variedade de aminoácidos para a atividade metabólica. Por exemplo, a levedura metilotrófica é conhecida por utilizar a metilamina a partir do carbono para formar a trealose ou o glicerol (Bellion *et al.*, *Microb. Growth C1 Compd.*, [Int. Symp.], 7º (1993), 415 - 32. Editor(es): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK). Da mesma forma, diversas espécies de *Candida* irão metabolizar a alanina ou o ácido oléico (Sulter *et al.*, *Arch. Microbiol.*, 153: 485 - 489 (1990)). Por isso, é contemplada a possibilidade da fonte de carbono utilizada na presente invenção poder incluir uma grande variedade de substratos que contêm carbono e apenas será limitada pela escolha do organismo.

Embora seja contemplado que todos os substratos de carbono mencionados acima e suas misturas sejam adequadas na presente invenção, os substratos de carbono preferidos são a glicose, frutose e sacarose.

Além de uma fonte de carbono adequada, os meios de fermentação devem conter minerais apropriados, sais, cofatores, tampões e outros componentes, conhecidos pelos técnicos no assunto, propício para o cultivo das culturas e promoção da via enzimática necessária para a produção do produto desejado.

#### CONDIÇÕES DA CULTURA

Normalmente, as células são cultivadas a uma temperatura no intervalo de cerca de 20° C a cerca de 37° C em um meio apropriado. O meio de cultura adequado da presente invenção é o meio comum preparado comercialmente (tal como o caldo que inclui a base de nitrogênio de levedura, o sulfato de amônio e a dextrose como a fonte de carbono e energia) ou meio YPD, uma mistura de peptona, extrato de levedura e dextrose em proporções ótimas para o cultivo da maioria das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Outros meios de cultura definidos ou sintéticos também podem ser utilizados e o meio adequado para o cultivo do microrganismo em questão será conhecido por um técnico no assunto da ciência de microbiologia ou fermentação.

Os intervalos apropriados de pH para a fermentação estão entre o pH 3,0 ao pH 7,5, em que o pH 4,5 ao pH 6,5 é preferido como condição inicial.

As fermentações podem ser realizadas em condições aeróbias ou anaeróbias, em que as condições anaeróbicas ou microaeróbias são as preferidas.

A quantidade de butanol produzida no meio de fermentação pode ser determinada utilizando um número de métodos conhecidos no estado da técnica, por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (GC).

#### BATELADA INDUSTRIAL E FERMENTAÇÕES CONTÍNUAS

O presente processo emprega um método de fermentação em bateladas. Uma fermentação em batelada clássica é um sistema fechado, em

que a composição do meio é definida no início da fermentação e não está sujeita à alterações artificiais durante a fermentação. Assim, no início da fermentação, o meio é inoculado com o(s) organismo(s) desejado(s) e a fermentação é deixada ocorrer sem nenhum acréscimo no sistema.

5 Normalmente, no entanto, uma fermentação em "batelada" é a batelada com relação à adição da fonte de carbono e as tentativas são muitas vezes realizadas em fatores de controle, tais como pH e concentração de oxigênio. Em sistemas de batelada, as composições do metabólito e da biomassa do sistema mudam constantemente até o momento em que a fermentação é

10 interrompida. Dentro da batelada, as células da cultura moderam de uma fase lag estática para uma fase log de alto crescimento e, finalmente, uma fase estacionária, em que a taxa de crescimento é reduzida ou interrompida. Se não tratadas, as células na fase estacionária acabarão por morrer. As células da fase log geralmente são responsáveis pela maior parte da produção do produto

15 final ou intermediário.

Uma variação no sistema em batelada padrão é o sistema de batelada alimentada. Os processos de fermentação em batelada alimentada são adequados também na presente invenção e incluem um sistema em batelada típico, com a ressalva de que o substrato é adicionado em

20 incrementos à medida que a fermentação progride. Os sistemas em batelada alimentada são úteis quando a repressão catabólica é capaz de inibir o metabolismo das células e onde é desejável dispor de uma quantidade limitada de substrato no meio. A medida da concentração do substrato real em sistemas de batelada alimentada é difícil e é, portanto, estimado com base nas

25 mudanças de fatores não mensuráveis, tais como pH, oxigênio dissolvido e a pressão parcial de gases residuais, tal como o CO<sub>2</sub>. As fermentações em batelada e batelada alimentada são comuns e bem conhecidas no estado da técnica e os exemplos podem ser encontrados em Thomas D. Brock em

*Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 2ª edição (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, ou Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36: 227; (1992), incorporados no presente como referência.

Embora a presente invenção seja executada em modo de  
5 batelada é contemplado que o método poderia ser adaptado aos métodos de  
fermentação contínua. A fermentação contínua é um sistema aberto onde um  
meio de fermentação definido é acrescentado continuamente a um bioreator e  
uma quantidade igual de meios condicionados é removida ao mesmo tempo  
para o processamento. Em geral, a fermentação contínua mantém as culturas  
10 com uma densidade elevada e constante, onde as células estão  
essencialmente no crescimento da fase log.

A fermentação contínua possibilita a modulação de um fator ou  
qualquer número de fatores que afetem o crescimento celular ou a  
concentração do produto final. Por exemplo, um método irá manter um  
15 nutriente limitante, tal como a fonte de carbono ou nível de nitrogênio em uma  
taxa fixa e permitir que todos os outros parâmetros se moderem. Em outros  
sistemas, uma série de fatores que afetam o crescimento pode ser alterada  
continuamente enquanto que a concentração de células, medida pela turbidez  
do meio, é mantida constante. Os sistemas contínuos se esforçam para manter  
20 condições estáveis de crescimento e, portanto, a perda de células devido ao  
meio sendo retirado deve ser equilibrado com a taxa de crescimento celular na  
fermentação. Os métodos de modulação de nutrientes e fatores de crescimento  
para os processos de fermentação contínua, bem como as técnicas para  
maximizar a taxa de formação do produto são bem conhecidos no estado da  
25 técnica da microbiologia industrial e uma variedade de métodos são detalhados  
por Brock, acima.

É contemplado que a presente invenção possa ser praticada  
utilizando a batelada, batelada alimentada ou processos contínuos e que

qualquer realização conhecida da fermentação seria adequada. Além disso, é contemplado que as células podem ser imobilizadas em um substrato, como catalisadores de células inteiras e submetidas às condições de fermentação para a produção do 1-butanol.

#### 5 MÉTODOS PARA O ISOLAMENTO DO BUTANOL DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

O butanol bioproduzido pode ser isolado do meio de fermentação, utilizando os métodos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, os sólidos podem ser retirados do meio de fermentação por centrifugação, filtração, decantação ou similares. Em seguida, o butanol pode ser isolado do  
10 meio de fermentação, que foi tratado para a remoção de sólidos, conforme descrito acima, utilizando métodos, tais como a destilação, extração líquido-líquido ou de separação com base em membranas. Pelo fato do butanol formar um ponto de ebulição baixo, na mistura azeotrópica com a água, a destilação só pode ser utilizada para separar a mistura até a sua composição azeotrópica.  
15 A destilação pode ser utilizada em combinação com outro método de separação para obter a separação em torno do azeótropo. Os métodos que podem ser utilizados em combinação com a destilação para isolar e purificar o butanol incluem, mas não limitado a, decantação, extração líquido-líquido, adsorção e técnicas baseadas em membranas. Além disso, o butanol pode ser  
20 isolado por meio da destilação azeotrópica utilizando um agente de arraste (vide, por exemplo, Doherty and Malone, *Conceptual Design of Distillation Systems*, McGraw Hill, New York, 2001).

A mistura água-butanol forma um azeótropo heterogêneo de modo que a destilação pode ser utilizada em combinação com a decantação  
25 para isolar e purificar o butanol. Neste método, o caldo de fermentação contendo butanol é destilado para perto da composição azeotrópica. Em seguida, a mistura azeotrópica é condensada, e o butanol é separado do meio de fermentação por decantação. A fase aquosa decantada pode ser devolvida

à primeira coluna de destilação como refluxo. O butanol rico em fase orgânica decantada pode ainda ser purificado por destilação em uma segunda coluna de destilação.

O butanol também pode ser isolado do meio de fermentação utilizando a extração líquido-líquido em combinação com a destilação. Neste método, o butanol é extraído do caldo de fermentação utilizando a extração líquido-líquido com um solvente apropriado. A fase orgânica contendo butanol é destilada para separar o butanol do solvente.

A destilação em combinação com a adsorção também pode ser utilizada para isolar o butanol do meio de fermentação. Neste método, o caldo de fermentação contendo o butanol é destilado para perto da composição azeotrópica e então a água remanescente é removida através da utilização de um adsorvente, tais como peneiras moleculares (Aden *et al.*, *Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover*, Report NREL/TP-510-32438, National Renewable Energy Laboratory, June 2002).

Adicionalmente, a destilação em combinação com a pervaporação pode ser utilizada para isolar e purificar o butanol do meio de fermentação. Neste método, o caldo de fermentação contendo o butanol é destilado próximo à composição azeotrópica e, então, a água remanescente é removida por pervaporação através de uma membrana hidrófila (Guo *et al.*, *J. Membr. Sci.* 245, 199 - 210 (2004)).

#### EXEMPLOS

A presente invenção é ainda definida nos seguintes Exemplos. Deve ser entendido que esses exemplos, embora indiquem realizações preferidas da presente invenção, são dados apenas a título de ilustração. A partir da discussão acima e destes exemplos, um técnico no assunto pode certificar as características essenciais da presente invenção, e sem se afastar

do espírito e seu escopo, pode realizar diversas alterações e modificações da presente invenção para adaptá-la às várias utilizações e condições.

#### MÉTODOS GERAIS

O padrão de DNA recombinante e as técnicas de clonagem  
5 molecular utilizadas nos exemplos são bem conhecidos no estado da técnica e  
são descritos por Sambrook, J., Fritsch, EF e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A  
Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor,  
NY (1989) (Maniatis) e por T. J. Silhavy, M. L. Bannan, e L. W. Enquist,  
*Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
10 Spring Harbor, Nova Iorque (1984) e Ausubel, F. M. *et al.*, *Current Protocols in  
Molecular Biology*, publicado pela Assoc. Publishing Greene and Wiley-  
Interscience (1987), e *Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor  
Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Os materiais e métodos adequados para a manutenção e o cultivo  
15 de culturas bacterianas são bem conhecidos no estado da técnica. As técnicas  
adequadas para a utilização nos seguintes exemplos podem ser encontradas  
tal conforme estabelecido no *Manual of Methods for General Bacteriology*  
(Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis  
A. Wood, Noel R. Krieg e G. Phillips Briggs, eds), *American Society for  
20 Microbiology*, Washington, DC. (1994)) ou por Thomas D. Brock em  
*Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 2ª edição, Sinauer  
Associates, Inc., Sunderland, MA (1989). Todos os reagentes, as enzimas de  
restrição e os materiais utilizados para o cultivo e manutenção das células  
microbianas foram obtidos pela Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), BD  
25 Diagnostic Systems (Sparks, MD), Life Technologies (Rockville, MD), ou Sigma  
Chemical Company (St. Louis, MO), salvo indicação em contrário. As cepas  
microbianas foram obtidas pela American Type Culture Collection (ATCC),  
Manassas, VA, salvo indicação em contrário. Os *primers* de oligonucleotídeos

utilizados nos exemplos a seguir são apresentados na Tabela 3. Todos os *primers* de oligonucleotídeos foram sintetizados pela Sigma-Genosys (Woodlands, TX) ou DNA Integrated Technologies (Coralsville, IA).

O meio sintético completo é descrito em Amberg, Burke e  
5 Strathern, 2005, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

### MÉTODO GC

O método GC utilizou uma coluna HP-Innowax (30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm de filme) da Agilent Technologies (Santa Clara, CA). O gás de  
10 arraste foi o hélio a uma vazão de 1 mL/min, medido a 150° C, com pressão de cabeça constante; injetor com divisor era de 1:10 a 200° C, a temperatura do forno era de 45° C por 1 min, 45° C a 230° C a 10° C/min, e 230° C por 30 segundos. A detecção FID foi utilizada a 260° C, com 40 mL/min de gás hélio. As amostras do caldo de cultura foram filtradas através de filtros de malha  
15 rotativa de 0,2 µM antes da injeção. Dependendo da sensibilidade analítica desejada, volume de injeção de 0,1 µL ou 0,5 µL foram utilizados. As curvas padrão calibradas foram geradas para os seguintes compostos: etanol, isobutanol, acetoína, meso-2,3-butanodiol e (2S, 3S)-2,3-butanodiol. Os padrões analíticos também foram utilizados para identificar os tempos de  
20 retenção para o isobutiraldeído, ácido isobutírico e álcool isoamílico.

### HPLC

A análise para a fermentação da composição do produto é bem conhecida pelos técnicos no assunto. Por exemplo, um método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utiliza uma coluna Shodex  
25 SH-1011 com uma coluna guarda Shodex SH-G (ambos disponíveis pela Waters Corporation, Milford, MA), com detecção do índice de refração (RI). A separação cromatográfica é obtida utilizando o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,01 M como a fase móvel com uma vazão de 0,5 mL/min e temperatura de coluna de 50° C. O

tempo de retenção do isobutanol é 47,6 minutos.

Para o Exemplo 15, a concentração de isobutanol na fase aquosa foi determinada por HPLC (Waters Alliance Modelo, Milford, MA ou Agilent 1100 Series, Santa Clara, CA) utilizando uma coluna de açúcar Shodex 5 SH1011, 8,0 mm x 300 mm, (Showa Denko KK, Kanagawa, no Japão (por meio de instrumentos Thompson, Clear Brook, VA)) com 0,01 N de ácido sulfúrico aquoso, isocrático, como o eluente. A amostra foi passada através de uma seringa de 0,2 µm de filtro (NUVEM membrana GHP) em um frasco de HPLC. As condições para a execução do HPLC foram as seguintes:

10 Volume de injeção: 10 µL

Vazão: 0,80 mL/minuto

Tempo de execução: 32 minutos

Temperatura da coluna: 50° C.

Detector: índice de refração

15 Detector de temperatura: 40° C

Deteção por UV: 210 nm, 4 nm de largura de banda

Após a execução, a concentração da amostra foi determinada a partir de uma curva padrão para o isobutanol. O tempo de retenção foi de 27,0 minutos.

20 O significado das siglas é a seguinte: "s" significa segundo (s), "min" significa (s) minuto, "h" significa hora (s), "psi" significa libras por polegada quadrada, "nm" significa nanômetros, "d" significa dia(s), "µL" significa microlitro(s), "mL" significa mililitro(s), "L" meio litro(s), "mm" meio milímetro(s), "nm" significa nanômetros, "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" 25 significa milimol(s), "µmol" significa micromol(s), "g" significa grama(s), "µg" significa micrograma(s) e "ng" significa nanograma(s), "PCR" significa reação em cadeia da polimerase, "OD" significa densidade óptica, "OD<sub>600</sub>" significa a densidade óptica medida em um comprimento de onda de 600 nm, "kDa"

significa kilodaltons, “g” significa a gravitação constante, “bp” significa pares de base, “kbp” significa par em kilobase(s), “% em w/v” significa porcentagem em peso/volume, “% v/v” significa porcentagem em volume/volume, “wt%” significa porcentagem em peso, “HPLC” significa cromatografia líquida de alta performance, e “CG” significa cromatografia gasosa. O termo “seletividade molar” é o número de mols de produto produzido por mol de substrato de açúcar consumido e é relatado como uma porcentagem.

### EXEMPLO 1

#### INTERRUPÇÃO DOS GENES DE PIRUVATO DESCARBOXILASE

10 O objetivo deste exemplo é descrever a interrupção de genes de piruvato descarboxilase em *S. cerevisiae* por deleção cromossômica dos genes que codificam as três principais isoenzimas: *PDC1*, *PDC5* e *PDC6*.

O gene *PDC1*, que codifica uma primeira isozima de piruvato descarboxilase, foi interrompido pela inserção de um cassete marcador de LEU2 por recombinação homóloga, que eliminou completamente a sequência de codificação *PDC1* endógena. O marcador LEU2 em pRS425 (ATCC nº 77106) foi amplificado por PCR de DNA plasmidial utilizando a DNA polimerase Phusion (New England Biolabs Inc., Beverly, MA catálogo sem F-540S) utilizando os *primers* *PDC1::LEU2-F* e *PDC1::LEU2-R*, dada como a SEQ ID  
15 Nos.: 102 e 103, que gerou 2,0 kb de produto da PCR. A porção *PDC1* de cada *primer* foi derivada da região 5' *upstream* do promotor *PDC1* e da região 3' *downstream* do terminador transcricional, tal que a integração dos marcadores de LEU2 resultam na substituição da região de codificação *pdc1*. O produto da PCR foi transformado na *S. cerevisiae* BY4741 (ATCC 201388) através de  
25 técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pág. 201 - 202), e os transformantes foram selecionados nos meios sintéticos completos sem leucina e suplementados com 2% de glicose a 30° C. Os transformantes foram

5 analisados por PCR utilizando os *primers* 112.590-30E e 112.590-30F, dados como a SEQ ID Nos.: 104 e 105, para verificar a integração no *locus* cromossômico *PDC1* com a substituição da região de codificação *PDC1*. Os transformantes corretamente identificados apresentam o genótipo: BY4741 *pd*

10 *cdc1::LEU2*.  
O *locus PDC5* que codifica uma segunda isozima de piruvato descarboxilase foi deletado pela interrupção do gene. Um cassete *pd*  
*cdc5::kanMX4* foi amplificado por PCR a partir da cepa de DNA YLR134W cromossômica (ATCC nº 4034091), utilizando a DNA polimerase Phusion e os  
15 *primers* PDC5: KanMXF e PDC5: KanMXR, dado como SEQ ID Nos.: 106 e 107, o que gerou um produto de PCR de cerca de 2,2 kb. A porção *PDC5* de cada *primer* foi derivada da região 5' *upstream* do promotor *PDC5* e da região 3' *downstream* da região de codificação, de tal forma que a integração do marcador *kanMX4* resultou na substituição da região de codificação *PDC5*. O  
20 produto da PCR foi transformado em BY4741 *pd*  
*cdc1::LEU2* utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202), e os transformantes foram selecionados em um meio YP suplementado com 1% de etanol e geneticina (200 µg/mL) a 30° C. Os transformantes foram analisados  
por PCR para verificar a correta integração no *locus PDC* com a substituição da região de codificação *PDC5* utilizando os *primers* PDC5kofor e N175, dado como a SEQ ID Nos.: 108 e 109, respectivamente. A identificação correta dos transformantes apresenta o genótipo: BY4741 *pd*  
*cdc1::LEU2 pd*  
*cdc5: kanMX4*.

25 A codificação do *locus PDC6* de uma terceira isoenzima da piruvato descarboxilase foi interrompida pela inserção de um marcador *MET15*. O marcador *MET15* foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pRS421 (ATCC nº 87475), utilizando a DNA polimerase Phusion e os *primers* 112590-46A e 112590-46B, dados como a SEQ ID Nos.: 110 e 111, respectivamente. A

porção PDC6 de cada *primer* foi derivada da região 5' *upstream* do promotor PDC6 e da região 3' *downstream* da região de codificação, tal que a integração do marcador *MET15* resultou na substituição da região de codificação PDC6. O produto da PCR foi transformado em BY4741 *cdc1::leu2 cdc5::kanMX4* utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202), e os transformantes foram selecionados no meio sintético completo sem metionina e suplementado com etanol a 1% a 30° C. Os transformantes foram analisados por PCR para verificar a integração cromossômica correta no *locus* PDC6 com a substituição da região de codificação PDC6 utilizando os *primers* 112590-34E e 112590-34F, dado como a SEQ ID Nos.: 112 e 113, respectivamente. Os transformantes corretamente identificados apresentam o genótipo: BY4741 *cdc1::LEU2 cdc5::kanMX4 cdc6::MET15*.

## EXEMPLO 2

### CEPAS DE *S. CEREVISIAE* PROJETADAS PARA A EXPRESSÃO CITOSÓLICA DA ACETOLACTATO SINTASE E DELEÇÃO DOS GENES DA PIRUVATO DESCARBOXILASE

O objetivo deste exemplo é descrever a construção e introdução dos genes de acetolactato sintase para a expressão no citosol de uma cepa de levedura, que também tem deleções de genes da piruvato descarboxilase *PDC1* e *PDC5*. Dois promotores de leveduras foram utilizados para controlar de forma independente a expressão do gene *alsS* - o promotor FBA glicolítico de frutose 1,6-bifosfato aldolase da *S. cerevisiae* ou o promotor do gene *HIS3* de imidazol glicerol-fosfato desidratase da *S. cerevisiae*.

O plasmídeo de expressão pRS426-FBAp-*alsS* foi construído através das seguintes etapas. O fragmento da região de codificação *alsS* de 1,7 kb de pRS426::*GPD*::*alsS*::*CYC* foi isolado pela purificação do gel após a digestão de *BbvCI* e *PacI*. Este plasmídeo possui um gene quimérico contendo o promotor *GPD1* (SEQ ID No. 114), a região de codificação *alsS*

do *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 3) e o terminador CYC1 (SEQ ID No. 115) e foi descrito na patente US 2007/0092957 A1 de propriedade comum e co-pendente, o Exemplo 17 que é incorporado no presente como referência. O fragmento ILV5 do plasmídeo pRS426::FBA::ILV5::CYC, também descrito no  
5 pedido de patente US 2007/0.092.957 A1, Exemplo 17, foi removido por digestão enzimática com *BbvCI* e *Pacl* e o fragmento do vetor remanescente de 6,6 kb foi purificado com gel. Este vetor possui um gene quimérico contendo o promotor FBA (SEQ ID No. 116) e terminator CYC1 que liga a região de codificação do gene ILV5 da *S. cerevisiae* (SEQ ID No. 37). Estes  
10 dois fragmentos purificados foram ligados durante a noite a 16° C e transformados nas células quimicamente competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Os transformantes foram obtidos pelo cultivo de células em meio LB Amp100. A inserção de *alsS* no vetor foi confirmada pelo padrão da digestão enzimática e PCR (*primers* N98SeqF1 e N99SeqR2, SEQ ID Nos.:  
15 117 e 118).

O cassete de interrupção *pdc1:FBAp-alsS-LEU2* foi criado pela união do segmento *FBAp-alsS* a partir do *pRS426-FBAp-alsS* para o gene *LEU2* a partir do *pRS425* (ATCC nº 77106) por SOE PCR (conforme descrito por Horton *et al.*, (1989) *Gene* 77: 61 - 68) utilizando como modelo os DNAs  
20 plasmidiais de *pRS426-FBAp-alsS* e *pRS425*, com a DNA polimerase Phusion (New England Biolabs Inc., Beverly, MA; catálogo nº F-540S) e os *primers* 112590-48A e 112590-30B até D, dados como a SEQ ID Nos.: 119, SEQ ID Nos.: 120 - 122. Os *primers* externos para a SOE PCR (112590-48A e 112590-30D) continham regiões de 50 pb a 5' e 3' homólogas às regiões *upstream* e  
25 *downstream* do promotor *PDC1* e terminator. O fragmento de PCR de cassete completo foi transformado em BY4741 (ATCC nº 201388) e os transformantes foram mantidos em meios sintéticos completos sem leucina e suplementados com 2% de glicose a 30° C utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in*

*Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratório de Imprensa, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202). Os transformantes foram analisados por PCR utilizando os *primers* 112.590-30E e 112.590-30F, dados como a SEQ ID Nos.: 104 e 105, para verificar a integração no *locus PDC1* com deleção da região de codificação *PDC1*. Os transformantes corretos têm o genótipo: 5 BY4741 *pdc1::FBAp-alsS-LEU2*.

Um cassete de interrupção *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2* foi criado por meio da amplificação do promotor HIS3 a partir do pRS423 (ATCC nº 77104), com a DNA polimerase Phusion e unindo-se a um cassete amplificado por PCR 10 de *alsS-LEU2* a partir da cepa BY4741 *pdc1::FBAp-alsS-LEU2*. Os *primers* utilizados para a PCR, 112590-48B até 112.590-48D e 112.590-45B, são dados como a SEQ ID NOs: 161 - 163 e 164. Os *primers* externos para a SOE PCR continham regiões de 50 pb a 5' e 3' homólogas às regiões *upstream* e *downstream* do promotor *PDC1* e do terminator. O cassete completo 15 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2* foi transformado em BY4741 e os transformantes foram mantidos em meios sintéticos completos sem leucina e suplementados com 2% de glicose a 30° C (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202). Os transformantes foram analisados por PCR utilizando os *primers* externos 20 112.590-30E e 112.590-30F, dados como a SEQ ID Nos.: 104 e 105, para verificar a integração no *locus PDC1* com deleção da região de codificação *PDC1*. Os transformantes corretos apresentam o genótipo: BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2*.

O *locus PDC5* que codifica a segunda isoenzima do piruvato 25 descarboxilase foi deletado pela interrupção do gene. O cassete *pdc5::kanMX4* foi amplificado por PCR utilizando a polimerase de DNA Phusion da cepa de DNA cromossômico YLR134W (ATCC nº 4034091), utilizando os *primers* *PDC5::KanMXF* e *PDC5::KanMXR*, dados como as SEQ ID Nos.: 106 e 107, o

que gerou um produto da PCR de cerca de 2,2 kb. A porção PDC5 de cada *primer* foi derivada da região 5' *upstream* do promotor de *PDC5* e a região 3' *downstream* da região de codificação, tal que a integração dos marcadores *kanMX4* resultaram na substituição da região de codificação *PDC5*. O produto de PCR foi transformado em BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2* e BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2* utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, pags. 201 - 202), com seleção no meio YP suplementado com 1% de etanol e geneticina (200 µg/mL) a 30° C. Os transformantes foram selecionados por PCR para verificar a correta integração cromossômica utilizando os *primers* PDC5kofof e N175, dados como a SEQ ID Nos.: 108 e 109, respectivamente. Os transformantes corretos apresentam o genótipo: BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4*.

### EXEMPLO 3

#### VETOR DE CONSTRUÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BUTANODIOL

O objetivo deste exemplo é descrever a construção de vetores para a expressão do acetolactato descarboxilase, butanodiol desidrogenase e, opcionalmente, acetolactato sintase e/ou atividade de desidrogenase de álcool secundário no citosol da levedura.

#### CONSTRUÇÃO DO PRS423::CUP1-ALSS + FBA-BUDA

O gene *budA* que codifica a acetolactato descarboxilase foi amplificado a partir do DNA genômico preparado a partir da *Klebsiella pneumonia* (ATCC # 25955), utilizando o Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Inc.). Os *primers* utilizados (N579 e N580, fornecidos como a SEQ ID Nos.: 123 e 124) adicionaram a sequência *upstream* do códon de iniciação que era homólogo ao promotor FBA da levedura e a sequência *downstream* do códon de parada, que era homólogo

ao terminador ADH da levedura. O plasmídeo pRS423::CUP1-alsS + FBA-ILV3, que possui um gene quimérico contendo o promotor CUP1 (SEQ ID No. 125), região de codificação alsS do *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 3) e terminator CYC1 (SEQ ID No. 115), bem como um gene quimérico contendo o promotor FBA (SEQ ID No. 116), a região de codificação ILV3 da *S. cerevisiae* (SEQ ID No. 45), e terminator ADH1 (SEQ ID No. 126) (descrito na patente US 2007/0092957 A1 de propriedade comum e co-pendente, Exemplo 17) foi digerido com restrição com *NcoI* e *PmlI* para remover a região de codificação ILV3. A banda do vetor de 11,1 kb foi purificada com gel. Cerca de 1 µg de DNA do vetor de corte foi combinado com um 1 µg do produto da PCR budA e transformado na cepa BY4741 de *S. cerevisiae*. A inserção e o vetor foram combinados por recombinação homóloga *in vivo* para formar um vetor circular (também conhecido como "clonagem de reparação do intervalo"; descrito em Ma *et al.*, (1987) *Genetics* 58: 201 - 216) que permite a retenção do marcador selecionável (neste caso, HIS3). Os transformantes foram selecionados em um meio sintético completo sem histidina. As colônias foram colocadas em uma nova placa e as células foram utilizadas para preparar o DNA plasmidial (Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research). A PCR foi utilizada para a triagem dos plasmídeos para a presença de alsS (*primers* N98SeqF1 e N99SeqR2, SEQ ID Nos.: 117 e 118) e para a inserção adequada de budA (N160SeqF1 e N84SeqR2, SEQ ID Nos.: 127 e 128).

#### CONSTRUÇÃO DE PRS426:FBA-BUDC

A região de codificação budC para o butanodiol desidrogenase foi amplificada a partir do DNA genômico preparado a partir da *Klebsiella pneumonia* (ATCC 25955), utilizando o Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Inc.). Os *primers* utilizados (N581 e N582, fornecidos como a SEQ ID Nos.: 129 e 130) adicionaram a sequência

*upstream* do códon de iniciação que era homólogos ao promotor FBA da levedura e da sequência *downstream* do códon de parada, que era homólogo do terminador CYC1 da levedura. O plasmídeo pRS426::FBA::alsS (descrito no Exemplo 2, também chamado de pRS426-FBAp-alsS) foi digerido com *Bbv*CI e *Pac*I para liberar um fragmento de *alsS*. O vetor linear remanescente  
5 foi purificado em gel. Cerca de 1 µg do vetor foi combinado com um 1 µg de produto de PCR *budC* e transformado em BY4741 para os clones de reparo do intervalo obtidos (vide acima). Os transformantes foram selecionados em um meio sintético completo sem uracila. Os plasmídeos foram preparados a partir de trechos de cinco colônias transformantes. A presença da FBA-*budC*  
10 foi selecionada por PCR utilizando os *primers* N160SeqF1 e N582 (SEQ ID Nos.: 127 e 130).

#### **CONSTRUÇÃO DE PRS423::FBA-BUDC + FBA-BUDA**

O pRS423: CUP1-alsS + vetor FBA-*budA*, descrito acima foi digerido com *Sac*II e *Mlu*I para remover CUP1-alsS. A digestão de *Sac*II/*Mlu*I  
15 também foi utilizada para isolar FBA-*budC* de pRS426: FBA-*budC* (vide acima). Os fragmentos adequados (fragmento do vetor de 7,6 kb e fragmento FBA-*budC* de 1,6 kb) foram purificados em gel, ligados e transformados em células competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). As colônias transformantes foram  
20 analisadas por PCR para confirmar a incorporação do fragmento *budC* utilizando os *primers* N581 e N582 (SEQ ID Nos.: 129 e 130).

#### **CONSTRUÇÃO DE PRS425: GPM-SADB**

Um fragmento de DNA que codifica uma butanol desidrogenase (proteína de SEQ ID No. 36) a partir da *Achromobacter xylosoxidans* (descrita  
25 no pedido de patente US CL3926 de propriedade comum e co-pendentes) foi clonado. A região de codificação deste gene chamado *sadB* para a desidrogenase de álcool secundário (SEQ ID No. 35) foi amplificada, utilizando as condições padrão do DNA genômico de *A. xylosoxidans*, preparada

utilizando a Gentra Puregene kit (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN; número de catálogo D-5500A), seguindo o protocolo recomendado para organismos gram negativos utilizando os *primers* direto e reverso, N473 e N469 (SEQ ID Nos.: 131 e 132), respectivamente. O produto da PCR foi TOPO-Blunt  
5 clonado em pCR4 BLUNT (Invitrogen) para produzir pCR4Blunt::sadB, que foi transformado em células Mach-1 de *E. coli*. O plasmídeo foi posteriormente isolado de quatro clones e a sequência verificada.

A região sadB de codificação foi amplificada por PCR a partir do pCR4Blunt::sadB. Os *primers* de PCR continham ainda sequências 5' que se  
10 sobrepõem ao promotor GPM1 da levedura e o terminador ADH (N583 e N584, fornecido como a SEQ ID Nos.: 133 e 134). O produto da PCR foi então clonado utilizando a metodologia de "reparo do intervalo" em *Saccharomyces cerevisiae* (Ma *et al.* Ibid) conforme segue. O vetor de transporte da levedura - *E. coli* pRS425::GPM::kivD::ADH, que contém o promotor GPM (SEQ ID No.  
15 135), região de codificação kivD a partir da *Lactococcus lactis* (SEQ ID No. 47), e terminator ADH1 (SEQ ID No. 126) (descrito na patente US 2007/0092957 A1 de propriedade comum e co-pendente, Exemplo 17) foi digerido com enzimas de restrição e *BbvCI* e *PacI* para liberar a região de codificação kivD. Cerca de 1 µg do fragmento do vetor remanescente foi transformado pela cepa BY4741  
20 de *S. cerevisiae* juntamente com 1 µg do produto da PCR sadB. Os transformantes foram selecionados em um meio sintético completo sem leucina. O evento da recombinação adequada, gerando pRS425::GPM-sadB, foi confirmado por PCR utilizando os *primers* N142 e N459 (SEQ ID Nos.: 136 e 137).

25

#### **CONSTRUÇÃO DE PRS426: FBA-BUDC + GPM-SADB**

O cassete terminator do gene do promotor GPM-sadB-ADH foi transferido para pRS426 (ATCC nº 77107), um vetor de transporte de levedura - *E. coli* que leva o marcador de seleção URA3, através da clonagem de reparo

do intervalo. O cassete foi isolado do pRS425::GPM-sadB por digestão com *Sall* e *SacII*, e o vetor pRS426 foi linearizado com *BamHI* antes da ligadura. O vetor resultante, pRS426::GPM-sadB foi confirmado por PCR utilizando os primers N142 e N459 (SEQ ID Nos.: 136 e 137). A fim de incluir o gene *budC* que codifica a acetoina redutase da *Klebsiella pneumonia* a este vetor, um  
5 fragmento contendo *budC* foi removido do pRS423::FBA-*budC* + FBA-*budA* utilizando *SphI* e *SapI*.

Para a construção do pRS423::FBA-*budC* + FBA-*budA*, o vetor pRS423::CUP1-*alsS* + FBA-*budA*, descrito acima foi digerido com *SacII* e *MluI*  
10 para remover CUP1-*alsS*. A digestão de *SacII*/ *MluI* também foi utilizada para isolar FBA-*budC* do pRS426::FBA-*budC* (descrito acima). Os fragmentos adequados (fragmento do vetor de 7,6 kb e fragmento FBA-*budC* de 1,6 kb) foram purificados em gel, ligados e transformados em células competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). As colônias transformantes foram analisados por  
15 PCR para confirmar incorporação do fragmento *budC* utilizando os primers N581 e N582 (SEQ ID Nos.: 129 e 130).

O fragmento *SphI* - *SapI* *budC* do pRS423::FBA-*budC* + FBA-*budA* carrega porções do vetor *upstream* do promotor FBA, bem como parte do terminador ADH para permitir a clonagem através da clonagem por reparo do  
20 intervalo no vetor pRS426::GPM-sadB que foi linearizado com *SacII*. Os transformantes resultantes desta clonagem foram plaqueados em um meio sem uracila para selecionar a recombinação das duas sequências lineares. O vetor resultante, pRS426::FBA-*budC* + GPM-sadB foi confirmado por PCR utilizando os primers N581 e N582 (SEQ ID Nos.: 129 e 130).

25

#### EXEMPLO 4

#### PRODUÇÃO DE BUTANODIOL

O objetivo deste exemplo é o de descrever a produção de butanodiol em uma cepa de levedura. A cepa compreende deleções do

*PDC1* e *PDC5*, genes que codificam duas isoenzimas da piruvato descarboxilase e as construções para a expressão heteróloga do *alsS* (acetolactato sintase), *budA* (acetolactato descarboxilase), e *budC* (butanodiol desidrogenase). Opcionalmente, a cepa da levedura inclui ainda  
 5 uma construção para a expressão heteróloga de *sadB* (desidrogenase de álcool secundário).

#### CONSTRUÇÃO DA CEPA

Os plasmídeos pRS423::CUP1-*alsS* + FBA-*budA* e pRS426::FBA-*budC* foram introduzidos em BY4741  $\Delta$ *pdc1*::FBA-*alsS*  $\Delta$ *pdc5*::kanMX4 e em  
 10 BY4741  $\Delta$ *pdc1*::HIS3-*alsS*  $\Delta$ *pdc5*::kanMX4 por métodos de transformação mediados por PEG padrão/acetato de lítio. Os plasmídeos de pRS423::CUP1-*alsS* + FBA-*budA* e pRS426::FBA-*budC* + GPM-*sadB* foram introduzidos em  
 BY4741  $\Delta$ *pdc1*::HIS3-*alsS*  $\Delta$ *pdc5*::kanMX4. Em todos os casos, os transformantes foram selecionados em meio sintético completo sem glicose.  
 15 histidina e uracila. O etanol (1% v/v) foi utilizado como fonte de carbono. Depois de três dias, os transformantes foram colocados no meio sintético completo sem histidina e uracila. Este meio continha ambos glicose 2% e etanol a 1% como fonte de carbono. As cepas resultantes foram examinadas, conforme descrito abaixo.

#### PRODUÇÃO DE BDO A PARTIR DA GLICOSE EM FRASCOS DE AGITAÇÃO

20 As cepas BY4741  $\Delta$ *pdc1*::FBA-*alsS*  $\Delta$ *pdc5*::kanMX4/pRS423::CUP1-*alsS* + FBA-*budA*/pRS426::FBA-*budC* (Cepa 1 na Tabela 3) e BY4741  $\Delta$ *pdc1*::HIS3-*alsS*  $\Delta$ *pdc5*::kanMX4/pRS423::CUP1-*alsS* + FBA-*budA*/pRS426::FBA-*budC*  
 25 (Cepa 2 na Tabela 3) foram cultivadas em meio sintético completo sem uracila ou histidina, suplementado com 0,5% (v/v) de etanol. As cepas foram cultivadas em frascos de ventilação ou frascos selados, conforme listado na Tabela 3, com agitação (225 rpm) a 30° C. Após 48 horas, o

meio de cultura filtrado foi analisado por HPLC, utilizando o método da coluna de açúcar descrito no Método Geral.

**TABELA 3**

**PRODUÇÃO DO BUTANODIOL (BDO) EM CEPAS DE LEVEDURAS PROJETADAS**

Cepa	Condição da Cultura	Título BDO*, mM	Seletividade Molar BDO	Seletividade Molar do Glicerol
1	75 mL de cultura em frasco ventilado de 125 mL	76	0,64	0,47
1	40 mL de cultura em frasco selado de 50 mL	29	0,58	0,54
2	40 mL de cultura em frasco selado de 50 mL	52	0,64	0,51

5                   \* Butanodiol (BDO) se refere à soma do meso-2,3-butanodiol, (2S, 3S)-(+)-2,3-butanodiol e (2R, 3R)-(-)-2,3-butanodiol. As duas últimas formas também são referidos como  $\pm$ -butanodiol.

A seletividade molar é em mols de produto/mol de glicose consumida.

10                   **PRODUÇÃO DE BDO A PARTIR DA GLICOSE EM FERMENTADORES**

A cepa BY4741  $\Delta$ pdc1::FBA-alsS  $\Delta$ pdc5::kanMX4/pRS423::CUP1-alsS + FBA-budA/pRS426::FBA-budC (Cepa 1 na Tabela 3) foi cultivada em perplexo matraz agitado (*baffled flask*) de 2 L contendo 0,4 L de meio a 30° C, com agitação a 200 rpm. O meio contido por L: 6,7 g de base nitrogenada de levedura sem aminoácidos (DIFCO, produto nº 291.940), 0,1 g de L-leucina, 0,02 g de L-triptofano, 1,4 g de suplementos do meio de saída sintético de levedura sem histidina, leucina, triptofano e uracila (Sigma, produto nº Y2001), 20 g de D-glicose e 10 mL de etanol. Quando as células no frasco atingiram um OD<sub>600</sub> de 2,9, alíquotas de 60 mL foram utilizadas para inocular os fermentadores.

15

20

Um litro de fermentadores foi preparado com 540 mL de meio contendo (por L): 6,7 g base nitrogenada de levedura sem aminoácidos (DIFCO, produto nº 291.940), 0,2 g L-leucina, 0,04 g L-triptofano, 2,8 g de suplementos do meio de saída sintético da levedura sem histidina, leucina, triptofano e uracila (Sigma, produto nº Y2001) e 10 mL de etanol.

A D-glicose (50% p/p) foi adicionada em batelada alimentada, de modo que a concentração, inicialmente em 30 g/L, variou entre 30 e 5 g/L. A temperatura foi controlada em 30° C e o pH foi mantido no pH 5,5 com a adição de NaOH a 50% (w/w) ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 20% (p/v). O ar foi pulverizado no padrão de 0,3 litros por minuto, sem a pressão de volta e a velocidade de agitação mínima foi ajustada para 100 rpm. dO era 100% inicialmente e o rpm foi programado para controlar dO em 30%, no entanto, a demanda de oxigênio foi baixa e o dO de todos os fermentadores (Execuções nºs 1 a 3 na Tabela 5) permaneceram no intervalo de 90% durante toda a fase de pulverização de ar. Em dois fermentadores (Execuções em duplicata nºs 2 - 3), a pulverização de nitrogênio substituiu a pulverização de ar em 35 horas na execução. Ao longo da fermentação, as amostras foram retiradas para a massa de células (OD<sub>600</sub>), a utilização do substrato e as medidas de distribuição de subprodutos.

As concentrações de substrato e de subprodutos foram determinadas a partir da análise de HPLC. Os resultados estão resumidos na Tabela 4, abaixo. Apesar da diferença na pulverização do gás entre os fermentadores, os resultados não foram significativamente diferentes. O butanodiol (BDO, soma de meso-butanodiol e  $\pm$ -butanodiol) foi produzido em uma concentração média de 229 mM com uma seletividade molar de 0,63 (mol de butanodiol produzidos/ mol de glicose consumida). A seletividade molar obtida nos frascos de agitação foi idêntica à obtida nos fermentadores.

**TABELA 4****PRODUÇÃO FERMENTATIVA DO BUTANODIOL (BDO) UTILIZANDO A CEPA DE *E. COLI*****BY4741  $\Delta$ PDC1::FBA-ALSS  $\Delta$ PDC5::KANMX4/PRS423::CUP1-ALSS + FBA-BUDA/****PRS426::FBA-BUDC**

Execução	Tempo, h	OD <sub>600</sub>	Glicose consumida mM	Meso- butanodiol mM	$\pm$ - butanodiol mM	Glicerol mM	Seletividade molar do butanodiol
Execução 1	0	0,0	0	0	0	0	0,00
	4	0,3	20	7	2	9	0,47
	12	0,6	30	12	4	17	0,54
	20	1,0	53	23	7	33	0,56
	28	2,2	98	45	15	65	0,61
	36	3,1	164	69	23	100	0,56
	44	4,4	217	106	34	154	0,65
	52	5,1	307	148	43	212	0,62
	60	5,4	343	175	48	249	0,65
	68	6,1	412	207	55	295	0,63
	72	6,5	447	224	57	319	0,63
Execução 2	0	0,0	0	0	0	0	0,00
	4	0,3	19	7	2	10	0,52
	12	0,6	32	12	4	17	0,50
	20	1,0	58	22	7	32	0,50
	28	2,3	106	44	15	64	0,56
	36	3,5	170	70	23	101	0,55
	44	4,7	234	109	34	157	0,61
	52	5,9	327	154	44	217	0,61
	60	5,9	367	184	50	258	0,64
	68	6,8	441	219	57	304	0,63
	72	7,2	467	237	60	328	0,64
Execução	0	0,0	0	0	0	2	0,00

Execução	Tempo, h	OD <sub>600</sub>	Glicose consumida mM	Meso-butanodiol mM	±-butanodiol mM	Glicerol mM	Seletividade molar do butanodiol
3							
	4	0,3	19	7	2	12	0,51
	12	0,6	33	12	4	19	0,49
	20	1,1	58	23	7	36	0,52
	28	2,2	109	45	15	67	0,55
	36	3,4	173	73	24	107	0,56
	44	4,4	234	112	35	164	0,63
	52	6,3	326	153	44	220	0,61
	60	5,9	371	183	50	260	0,63
	68	6,7	445	218	57	307	0,62
	72	7,6	454	226	58	317	0,63

**COPRODUÇÃO DO BDO E 2-BUTANOL A PARTIR DO AÇÚCAR (GLICOSE OU SACAROSE) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE 2-BUTANONA**

A cepa BY4741  $\Delta pdc1::HIS3-alsS \Delta pdc5::kanMX4/pRS423::CUP1$  -alsS + ACE-budA/pRS426: FBA-budC + GPM-sadB foi cultivada em 50 mL de meio de cultura em frascos de 125 mL ventilados com agitação (225 rpm) a 30° C. O meio de cultura era um meio sintético completo sem uracila ou histidina, suplementado com 0,5% (v/v) de etanol com e sem 2-butanona. Ao utilizar a 2-butanona, as culturas foram inoculadas em frascos de soro (50 mL) contendo 40 mL de meio aeróbio (o mesmo meio que o acima, mas também contendo 83 mM de 2-butanona). Os frascos foram então vedados com rolhas e frisos. Os frascos foram incubados a 30° C sob agitação. Após 48 horas, o meio de cultura filtrado foi analisado por HPLC (método da coluna de açúcar).

A 2-butanona adicionada serve como substrato para a produção de 2-butanol pela desidrogenase de álcool secundário codificado por sadB, esta reação é utilizada para equilibrar os equivalentes redutores durante a

síntese de BDO conforme segue:

A formação da BDO a partir da glicose exige uma produção concomitante de um equivalente redutor (por exemplo, NADH):



Na ausência de 2-butanona, o equivalente redutor é absorvido pela produção de um composto mais reduzido do que a glicose, por exemplo, o glicerol:



Na presença de 2-butanona, o equivalente redutor é absorvido pela produção de uma forma mais reduzida derivada da 2-butanona, que atua como um dissipador de elétrons:



Assim, a maior produção é obtida a partir da glicose, na presença da o dissipador de elétrons de 2-butanona. Além disso, a capacidade da *S. cerevisiae*, que compreende  $\Delta\text{pdc1}::\text{HIS3-alsS} \Delta\text{pdc5/pRS423}::\text{CUP1-alsS}$ , em fornecer  $\geq 0,86$  equivalentes C6 (a partir da glicose ou sacarose) para um produto *downstream* de acetolactato foi demonstrada, conforme apresentado na Tabela 5.

**TABELA 5**

**PRODUÇÃO DE BUTANODIOL E 2-BUTANOL POR CEPA DE LEVEDURA PROJETADA**

Fonte de carbono	Dissipador de elétron	Título BDO (mM)	Rendimento molar BDO	Rendimento molar do glicerol	Título 2-butanol (mM)	% de rendimento teórico BDO
Glicose	Nenhum	73	0,62	0,25	-	62
Glicose	2-butanona	102	0,90	0,11	78	90
Sacarose	Nenhum	87	0,68	0,14	-	68
Sacarose	2-butanona	101	0,86	0,08	82	86

Os dados são as médias dos experimentos em duplicata.

A seletividade a partir da sacarose é normalizada por mol de açúcar C<sub>6</sub>.

A cepa BY4741  $\Delta pdc1::LEU2 \Delta pdc5::kanMX4$  (descrita no Exemplo 1) foi transformada com os plasmídeos pRS423::CUP1-alsS + FBA-budA e pRS426::FBA-budC + GPM-sadB (ambos plasmídeos descritos no Exemplo 3) para produzir a cepa BY4741  $\Delta pdc1::LEU2 \Delta pdc5::kanMX4/pRS423::CUP1-alsS + FBA-budA/pRS426::FBA-budC + GPM-sadB$ . Esta cepa (Cepa 4 na Tabela 6) contém alsS apenas em um plasmídeo, mas é isogênica com a Cepa 3 da Tabela 6, que contém duas cópias cromossômicas e do plasmídeo de alsS. A Cepa 3 da Tabela 6 é BY4741  $\Delta pdc1::HIS3-alsS \Delta pdc5::kanMX4/pRS423::CUP1-alsS + FBA-budA/pRS426::FBA-budC + GPM-sadB$  (descritos anteriormente no Exemplo 4). A Cepa 3 e dois isolados do tipo 4 foram cultivados na presença de glicose e 2-butanona (MEK), conforme descrito acima. O rendimento molar de BDO é indistinguível entre as cepas.

**TABELA 6**

**PRODUÇÃO DE BUTANODIOL E 2-BUTANOL POR CEPAS DE LEVEDURA PROJETADAS**

Cepa	Fonte de carbono	Dissipador de elétron	Título BDO (mM)	Rendimento molar BDO	Rendimento molar do glicerol	Título 2-butanol (mM)	% de rendimento teórico BDO
Cepa 3	Glicose	MEK	102	0,90	0,18	75	90
Cepa 4, isolado 1	Glicose	MEK	100	0,88	0,19	74	88
Cepa 4, isolado 2	Glicose	MEK	101	0,90	0,19	75	90

**EXEMPLO 5 (PROFÉTICO)****PRODUÇÃO DO 2-BUTANOL PELA CEPA *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE****EXPRESSANDO ADICIONALMENTE B<sub>12</sub> INDEPENDENTE DE DIOL DESIDRATASE**

Um butanodiol desidratase independente de B<sub>12</sub> (dependente de  
5 S-adenosilmetionina (SAM)) (SEQ ID No. 32) e suas reativase associada (SEQ  
ID No. 34) a partir da bactéria *Roseburia inulinivorans* são o tópico do pedido  
de patente US CL3893CIP de propriedade comum e co-pendente. As  
sequências que codificam as proteínas (SEQ ID Nos.: 31 e 33,  
respectivamente), a seguir designadas como rdhtA e rdhtB, respectivamente,  
10 foram sintetizadas como um fragmento de DNA (SEQ ID No. 138) pelos  
métodos convencionais e clonados em um vetor de *E. coli* (por DNA2.0, Inc.,  
de Menlo Park, CA). O clone resultante foi denominado pJ206::rdhtAB. O  
fragmento de DNA sintético também continha um sítio de ligação ao ribossomo  
de consenso a 5' da região que codifica rdhtA e os sítios de restrição terminal  
15 reconhecidos por BamHI (extremidade 5') e Sall (extremidade 3').

O pJ206::rdhtAB foi utilizado como um modelo de PCR para  
preparar os fragmentos da região de codificação RdhtA e RdhtB separados. A  
região de codificação de RdhtA para a diol desidratase foi amplificada por PCR  
utilizando os *primers* N695 e N696 (SEQ ID Nos.: 130 e 140). A região de  
20 codificação de RdhtB para a diol desidratase ativase foi amplificada por PCR  
utilizando os *primers* N697 e N698 (SEQ ID Nos.: 141 e 142). Os dois  
fragmentos de DNA foram combinados com um fragmento de DNA de  
terminator duplo (SEQ ID No. 143) que apresenta um terminador ADH (SEQ ID  
No. 126) e um terminador CYC1 (SEQ ID No. 115) adjacentes um ao outro em  
25 oposição à orientação utilizando SOE PCR (Horton *et al.*, (1989) *Gene* 77: 61 -  
68). O fragmento de terminação dupla foi isolado como um fragmento de 0,6 kb  
seguintes à digestão Pacl de pRS426::FBA-ILV5 + GPM-kivD (descrito na  
patente US 2007/0092957 A1 de propriedade comum e co-pendente, Exemplo

17). O fragmento de DNA resultante de 4 kb possuía regiões de codificação rdhtA e rdhtB em oposição à orientação de ambos os lados do terminator duplo, com a extremidade 3' de cada região de codificação adjacente à sequência de terminação dupla. Este fragmento de DNA foi então clonado pela metodologia de reparo no interalo (Ma *et al.*, (1987) *Genetics* 58:201-216) no  
5 vetor de transporte da levedura pRS426::FBA-ILV5 + GPM-kivD que foi preparado pela digestão com *BbvCI* para remover as regiões de codificação ILV5 e kivD e a sequência de terminação dupla entre as suas extremidades 3'.

O pRS426::FBA-ILV5 + GPM-kivD foi descrito na patente US  
10 2007/0092957 A1 de propriedade comum e co-pendente, Exemplo 17. Ele contém em ordem: o promotor FBA (SEQ ID No. 116), a região de codificação do gene ILV5 de *S. cerevisiae* (SEQ ID No. 37), o fragmento terminator duplo (SEQ ID No. 143), a região de codificação kivD a partir de *Lactococcus lactis* (SEQ NO D: 47) e o promotor GPM (SEQ ID No. 135), com as regiões de  
15 codificação ILV5 e kivD em orientação oposta.

O plasmídeo resultante, pRS426::RdhtAB, continha o gene rdhtA sob o controle do promotor FBA (SEQ ID No. 116) e o gene rdhtB sob controle do promotor do GPM (SEQ ID No. 135). A atividade da diol desidratase em vários clones de levedura foi confirmada pelo crescimento das células de  
20 levedura anaerobicamente na presença de 1,2-propanodiol e a análise do sobrenadantes da cultura quanto a presença de propanol por GC ou HPLC (conforme descrito nos Métodos Gerais).

A porção FBA-RdhtA+GPM-RdhtB do pRS426::RdhtAB é então integrada no genoma da levedura por recombinação homóloga, conforme  
25 segue. A região é amplificada a partir da construção do plasmídeo utilizando os primers N742 e N743 (SEQ ID Nos.: 144 e 145). Da mesma forma, o marcador URA3 é amplificado a partir de pRS426 (ATCC nº 77107), utilizando os primers N744a e N745a (SEQ ID Nos.: 146 e 147). Estes dois fragmentos de DNA são

então combinados utilizando SOE PCR (Horton *et al.*, (1989) *Gene* 77: 61 - 68). O produto linear é transformado na cepa BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX* que foi descrita no Exemplo 2.

Os transformantes são obtidos no meio sem uracila. A integração no *locus* PDC5 anterior (substituindo o marcador *kanMX4*) é confirmada por PCR e pela seleção de sensibilidade a geneticina. Os clones são testados quanto à atividade da diol desidratase conforme descrito acima. O marcador URA3 é reciclado por ao passar os clones na presença de ácido 5-fluorótico utilizando os métodos padrão da levedura (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). A PCR é utilizada para confirmar que os genes *RdhtA* *RdhtB* integrados não foram perturbados pela reciclagem do marcador.

A cepa resultante, BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS pdc5::RdhtAB* é então transformada com os plasmídeos da via do butanodiol *pRS423::CUP1-alsS + FBA-budA* e *pRS426::FBA-budC + GPM-sadB*, que foram descritos no Exemplo 3. A produção de BDO e/ou 2-butanol é confirmada nos transformantes resultantes por HPLC ou GC, conforme descrito nos Métodos Gerais. Espera-se que as células cultivadas com aeração vigorosa em glicose produzam apenas BDO e que as células cultivadas em condições mais anaeróbias convertam o BDO em 2-butanol. As repetidas passagens das cepas por condições anaeróbias pode aumentar a produção do 2-butanol, pois a via completa não resulta no acúmulo líquido de NADH e, portanto, não requer a perda de energia e de carbono para a formação do glicerol.

#### **EXEMPLO 6 (PROFÉTICO)**

#### **25 PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL EM *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE [BY4741 *PDC1::FBAP-ALS-S-LEU2 PDC5::KANMX4*]**

O propósito deste exemplo profético é descrever como a obtenção das produções de isobutanol em uma cepa de levedura que é interrompida

pelas atividades da piruvato descarboxilase e expressa a acetolactato sintase citosólica.

A construção dos vetores pRS423::CUP1p-alsS + FBAP-ILV3 e pHR81::FBAP-ILV5-GPMp-kivD é descrita na patente US 2007/0092957 A1, Exemplo 17. O pRS423::CUP1p-alsS + FBAP-ILV3 possui um gene quimérico contendo o promotor CUP1 (SEQ ID No. 125), a região de codificação alsS do *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 3) e do terminator CYC1 (SEQ ID No. 115), bem como um gene quimérico contendo o promotor FBA (SEQ ID No. 116), a região de codificação do gene ILV3 de *S. cerevisiae* (SEQ ID No. 45) e o terminador ADH1 (SEQ ID No. 126). O pHR81: FBAP-ILV5 + GPMp-kivD é o vetor pHR81 (ATCC No 87541) com um gene quimérico contendo o promotor FBA, a região de codificação do gene ILV5 de *S. cerevisiae* (SEQ ID No. 37) e o terminator CYC1, assim como um gene quimérico contendo o promotor GPM (SEQ ID No. 135), a região de codificação do gene kivD de *Lactococcus lactis* (SEQ ID No. 47) e o terminador ADH1. O pHR81 apresenta marcadores de seleção URA3 e LEU2-d.

A codificação do locus *PDC6* que codifica uma terceira isoenzima da piruvato descarboxilase é interrompida pela inserção de um marcador MET15 em BY4741 pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 (descrito no Exemplo 2) utilizando o método descrito no Exemplo 1. Os transformantes corretos são identificados apresentando o genótipo: BY4741 pdc1::LEU2 pdc5::kanMX4 pdc6::MET15.

Os vetores do plasmídeo pRS423::CUP1p-alsS + FBAP-ILV3 e pHR81::FBAP-ILV5 + GPMp-kivD são transformados em cepas BY4741 pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 ou BY4741 pdc1::LEU2 pdc5::kanMX4 pdc6::MET15 utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e mantidas em meios sintéticos completos sem histidina e uracila, e

suplementados com etanol a 1%. As culturas aeróbicas são cultivadas em frascos de 250 mL contendo 50 mL do meio sintético completo sem histidina e uracila e suplementado com 2% de glicose e etanol a 0,5% em uma incubadora Innova4000 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) a 30° C e 225 rpm. As  
5 culturas de baixo oxigênio são preparadas pela adição de 45 mL de meio em frascos de soro de 60 mL que estão fechados com tampas frisadas após a inoculação e mantidas a 30° C. Cerca de 24 he 48 h após a indução com 0,03 mM de CuSO<sub>4</sub> (concentração final), uma alíquota do caldo é analisada por HPLC (coluna de Shodex Sugar SH1011 (Showa Denko America, Inc., NY)  
10 com índice de refração de detecção (RI) e GC (HP-Innowax, 0,32 mm x 0,25 mM X 30 m (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), com detecção por ionização de chama (FID) para o teor de isobutanol. O isobutanol é detectado.

#### EXEMPLO 7 (PROFÉTICO)

#### INTERRUPÇÃO DA FORMAÇÃO DO GLICEROL EM UMA CEPA DE *S. CEREVISIAE* COM 15 GENES DELETADOS QUE CODIFICAM A PIRUVATO DESCARBOXILASE E EXPRESSÃO CITOSÓLICA DA ACETOLACTATO SINTASE

O objetivo deste exemplo profético é descrever como interromper a formação de glicerol em uma cepa de levedura, que também é interrompida nos genes piruvato descarboxilase, e contém um cassete para a expressão da  
20 acetolactato sintase citosólica.

GPD1 codifica uma glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD, que é uma enzima chave na síntese de glicerol e desempenha um papel importante na oxidação celular do NADH. Um cassete de interrupção *gpd1::URA3* é construído pela amplificação por PCR do marcador URA3 apartir  
25 de pRS426 (ATCC nº 77107), com *primers* 112590-T8 e T9-112590, dados como a SEQ ID Nos.: 148 e 149. Estes *primers* criam um produto de PCR URA3 de 1,4 kb que contém 70 pb e extensões 5' e 3' idênticas às sequências *upstream* e *downstream* do locus *GPD1* cromossômico para a recombinação

homóloga. O produto da PCR é transformado em BY4741 *pdc1::FBAp-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4* utilizando técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202) com a seleção do meio sintético completo sem uracila e suplementado com 1% de etanol a 30° C. Os transformantes são selecionados por PCR utilizando os primers 112.590-T4 e 112.590-T10, dados como a SEQ ID Nos.: 150 e 151, para verificar a integração no sítio correto e a interrupção de *GPD1*. Os transformantes corretos apresentam o genótipo: BY4741 *pdc1::FBAp-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 gpd1::URA3* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 gpd1::URA3*. O marcador *URA3* é interrompido se desejado por plaqueamento em ácido 5-fluorótico (5FOA; Zymo Research, Orange, CA) utilizando técnicas de levedura padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York) produzindo cepas de BY4741 *pdc1::FBAp-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1* e BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1*.

O *GPD2* codifica uma glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD e é um homólogo funcional do *GPD1*. Um cassete de interrupção *gpd2::URA3* é construído pela amplificação por PCR do marcador de *URA3* a partir do pRS426 (ATCC nº 77107), com primers 112590-T11 e 112590-T12, dados como a SEQ ID Nos.: 152 e 153. Estes primers criam um produto de *URA3* PCR com 1,4 kb que contém 70 pb e extensões 5' e 3' idênticas às sequências *upstream* e *downstream* do locus *GPD2* cromossômico para a recombinação homóloga. O produto da PCR é transformado em BY4741 *pdc1::FBAp-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1* utilizando técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202) com a seleção em meio sintético completo sem

uracila e suplementado com 1% de etanol a 30° C. Os transformantes são selecionados por PCR utilizando os *primers* 112.590-T13 e 112590-T4, dados como a SEQ ID Nos.: 154 e 150, para verificar a integração no local correto e a interrupção de *GPD2*. Os transformantes corretos apresentam o genótipo:

5 BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 gpd2::URA3* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 gpd2::URA3*. O marcador URA3 é interrompido por plaqueamento em ácido 5-fluorótico (5FOA; Zymo Research, Orange, CA) utilizando as técnicas padrão de levedura (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

10 Nova York) produzindo cepas de BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2* e BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2*.

#### EXEMPLO 8 (PROFÉTICO)

##### PRODUÇÃO DO ISOBUTANOL EM *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE [BY4741

15 *PDC1::FBAP-ALSS-LEU2 PDC5::KANMX4 ΔGPD1 ΔGPD2*

O propósito deste exemplo profético é descrever como obter produções de isobutanol em uma cepa de levedura que é interrompida pelas atividades da piruvato descarboxilase e da glicerol-3-fosfato desidrogenase, e expressar a acetolactato sintase citosólica.

20 Os vetores do plasmídeo pRS423::CUP1p-alsS + FBAP-ILV3 e pHR81::FBAP-ILV5 + GMPp-kivD (vide Exemplo 6) são transformados na cepa BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2* (descrita no Exemplo 7) através de técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) mantidas

25 em um meio sintético completo sem histidina e uracila e suplementado com etanol a 1%. As culturas aeróbicas são cultivadas em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio sintético completo sem histidina e uracila e suplementadas com 2% de glicose e etanol 0,5% em uma incubadora

Innova4000 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) a 30° C e 225 rpm. As culturas de baixo oxigênio são preparadas pela adição de 45 mL de meio em frascos de soro de 60 mL que são fechados com tampas frisadas após a inoculação e mantidos a 30° C. Cerca de 24 h e 48 h após a indução com 0,03  
5 mM de CuSO<sub>4</sub> (concentração final), uma alíquota do caldo é analisada por HPLC (coluna Shodex Sugar SH1011 (Showa Denko America, Inc., NY) com índice de refração de detecção (RI)) e GC (HP-Innowax, 0,32 mm x 0,25 mm X 30 m (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), com detecção por ionização de chama (FID) para o teor de isobutanol. O isobutanol é detectado.

#### EXEMPLO 9 (PROFÉTICO)

#### AUMENTO DA ACESSIBILIDADE DO PIRUVATO PELA INTERRUÇÃO DA PIRUVATO DESIDROGENASE EM UMA CEPA DE *S. CEREVISIAE* COM GENES DELETADOS QUE CODIFICAM A PIRUVATO DESCARBOXILASE E EXPRESSÃO CITOSÓLICA DA ACETOLACTATO SINTASE

15 O propósito deste exemplo profético é descrever como aumentar a acessibilidade do piruvato interrompendo a piruvato desidrogenase em uma cepa de levedura que também é interrompida pela piruvato descarboxilase e glicerol-3-fosfato desidrogenase, e contém um cassete para a expressão da acetolactato sintase citosólica.

20 PDA1 codifica a subunidade alfa da piruvato desidrogenase. A piruvato desidrogenase, que consiste nas subunidades alfa (Pda1p) e beta (Pdb1p), é o componente E1 do grande complexo multienzimático da piruvato desidrogenase. As células sem *PDA1* são viáveis, mas a falta da atividade de piruvato desidrogenase mostra um crescimento mais lento na glicose e  
25 apresenta uma maior formação de curtos sem o DNA mitocondrial. Um cassete de interrupção *pda1::URA3* é construído pela amplificação por PCR do marcador URA3 a partir do pRS426 (ATCC nº 77107), com *primers* 112.590-T1 e 112.590-T2, dados como a SEQ ID Nos.: 155 e 156. Estes *primers* criam um

produto de PCR URA3 de 1,4 kb que contém 70 pb e extensões 5' e 3' idênticas às sequências *upstream* e *downstream* do locus *PDA1* cromossômico para a recombinação homóloga. O produto da PCR é transformado em BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2* utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202) e mantidas em meios sintéticos completos sem uracila e suplementados com 1% de etanol a 30° C. Os transformantes são selecionados pela amplificação por PCR utilizando os *primers* 112.590-T3 e T4 112.590, dados como a SEQ ID Nos.: 157 e 150, para verificar a integração no local correto e a interrupção de *PDA1*. A ausência da atividade da piruvato desidrogenase também pode ser confirmada pela mensuração da atividade enzimática, tal conforme descrito por Neveling *et al.*, (*J. Bacteriol.* 180 (6): 1540-8). Os transformantes corretos apresentam o genótipo: BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2 pda1::URA3* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2 pda1::URA3*. O marcador URA3 é interrompido se desejado por plaqueamento em ácido 5-fluorótico (5FOA; Zymo Research, Orange, CA) utilizando as técnicas padrão de levedura (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York) produzindo cepas BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2 Δpda1* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2 Δpda1*.

#### EXEMPLO 10 (PROFÉTICO)

##### PRODUÇÃO DO ISOBUTANOL EM *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE [BY4741

##### *PDC1::FBAP-ALS-S-LEU2 PDC5::KANMX4 ΔGPD1 ΔGPD2 ΔPDA1*

O propósito deste exemplo profético é descrever como obter produções de isobutanol em uma cepa de levedura que é interrompida pelas atividades da piruvato descarboxilase, glicerol-3-fosfato desidrogenase e do

piruvato desidrogenase, e também expressar acetolactato sintase citosólica.

Os vetores do plasmídeo pRS423::CUP1p-*alsS* + FBAP-*ILV3* e pHR81::FBAP-*ILV5* + GPMp-*kivD* (vide Exemplo 6) são transformados na cepa BY4741 *pdc1*::FBAP-*alsS*-*LEU2* *pdc5*::*kanMX4*  $\Delta$ *gpd1*  $\Delta$ *gpd2*  $\Delta$ *pda1* (vide o Exemplo 9) através das técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e mantendo em meio sintético completo sem histidina e uracila e suplementado com etanol a 1%. As culturas aeróbicas são cultivadas em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio sintético completo (menos histidina e uracila), suplementado com 2% de glicose e etanol 0,5% em uma incubadora Innova4000 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) a 30° C e 225 rpm. As culturas de baixo oxigênio são preparadas pela adição de 45 mL de meio a 60 mL de frascos de soro que são selados com tampas frisadas após a inoculação e mantidos a 30° C. Cerca de 24 h e 48 h após a indução com 0,03 mM de CuSO<sub>4</sub> (concentração final), uma alíquota do caldo é analisada por HPLC (Shodex Sugar SH1011 coluna (Showa Denko America, Inc., NY) com índice de refração de detecção (RI)) e GC (HP-Innowax, 0,25 mm X 0,2 mM X 25 m (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), com detecção por ionização de chama (FID) para o teor de isobutanol.

20

#### EXEMPLO 11 (PROFÉTICO)

##### AUMENTO DA ACESSIBILIDADE DO PIRUVATO PELA SUPRESSÃO DA PIRUVATO

##### DESIDROGENASE EM UMA CEPA DE *S. CEREVISIAE* COM GENES DELETADOS QUE

##### CODIFICAM A PIRUVATO DESCARBOXILASE E A GLICEROL-3-FOSFATO

##### DESIDROGENASE E EXPRESSÃO CITOSÓLICA DA ACETOLACTATO SINTASE

25

O propósito deste exemplo profético é descrever como aumentar a acessibilidade do piruvato interrompendo a piruvato desidrogenase em uma cepa de levedura que também é interrompida pelo piruvato descarboxilase e glicerol-3-fosfato desidrogenase, e contém um cassete para a superexpressão

da acetolactato sintase.

PDA1 codifica a subunidade alfa da piruvato desidrogenase. A piruvato desidrogenase, que consiste nas subunidades alfa (Pda1p) e beta (Pdb1p), é o componente E1 do grande complexo multienzimático de piruvato desidrogenase. As células sem *PDA1* são viáveis, mas sem atividade de  
5 piruvato desidrogenase mostram um crescimento mais lento em glicose e apresentam uma maior formação de curtos sem o DNA mitocondrial. Para suprimir a expressão de *PDA1*, o promotor *PDA1* endógeno será substituído pelo promotor *GAL1* que é reprimido quando a glicose está presente no meio.

10 Um cassete de integração *URA3::GAL1p-PDA1* é construído por SOE PCR. O marcador *URA3* é amplificado a partir de pRS426 (ATCC nº 77107), com os *primers* 112590-T1 e 112590-T5, dados como a SEQ ID Nos.: 155 e 158. O promotor *GAL1* é amplificado por PCR a partir do plasmídeo pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) com os *primers* 112590-T6 e 112590-T7,  
15 dados como a SEQ ID Nos.: 159 e 160. Os dois produtos de PCR são fundidos por SOE PCR e amplificados com os *primers* externos 112.590-T1 e 112.590-T7, gerando um produto de PCR de 1,8 kb. Estes *primers* adicionam extensões 5' e 3' idênticas às sequências *upstream* do *locus PDA1* e à sequência de codificação *PDA1* por recombinação homóloga. O produto da PCR é  
20 transformado em BY4741 *cdc1::FBAp-alsS-LEU2 cdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2* ou BY4741 *cdc1::HIS3p-alsS-LEU2 cdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2* utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202) e mantidas em meios sintéticos completos sem uracila e suplementados com 1% de etanol  
25 a 30° C. Os transformantes são selecionados por PCR utilizando os *primers* 112.590-T3 e T4 112.590, dados como a SEQ ID Nos.: 157 e 150, para verificar a integração no sítio correto e a interrupção de *PDA1*. A supressão da atividade do piruvato desidrogenase é confirmada pela mensuração da

atividade enzimática, tal conforme descrito por Neveling, *et al.*, [*J. Bacteriol.* 180 (6): 1540-8]. Os transformantes corretos apresentam o genótipo: BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2 URA3::GAL1p-PDA1* ou BY4741 *pdc1::HIS3p-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2 URA3::GAL1p-PDA1*. O URA3 é interrompido se desejado pelo plaqueamento em ácido 5-fluorótico (5FOA; Zymo Research, Orange, CA) utilizando as técnicas padrão de levedura (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

### EXEMPLO 12 (PROFÉTICO)

10 PRODUÇÃO DO ISOBUTANOL EM *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE [BY4741  
PDC1::FBAP-ALS-S-LEU2 PDC5::KANMX4 ΔGPD1 ΔGPD2 GAL1P-PDA1]

O propósito deste exemplo profético é descrever como obter produções de isobutanol em uma cepa de levedura que é interrompida pelas atividades da piruvato descarboxilase e glicerol-3-fosfato desidrogenase, com  
 15 supressão da atividade da piruvato desidrogenase através da utilização do promotor de galactose, e expressar a acetolactato sintase citosólica.

Os vetores do plasmídeo pRS423::CUP1p-*alsS* + FBAP-*ILV3* e pHR81::FBAP-*ILV5* + GMPp-*kivD* (vide Exemplo 6) são transformados em cepas BY4741 *pdc1::FBAP-alsS-LEU2 pdc5::kanMX4 Δgpd1 Δgpd2 GAL1p-PDA1* (Exemplo 11) utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast*  
 20 *Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e mantidos em um meio sintético completo sem histidina e uracila e suplementado com etanol a 1%. As culturas aeróbicas são cultivadas em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio sintético completo (menos histidina e uracila), suplementado com 2% de glicose e etanol 0,5% em uma incubadora  
 25 Innova4000 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) a 30° C e 225 rpm. As culturas de baixo oxigênio são preparadas pela adição de 45 mL de meio em frascos de soro de 60 mL que são fechados com tampas frisadas após a

inoculação e mantidos a 30° C. Cerca de 24 h e 48 h após a indução com 0,03 mM de CuSO<sub>4</sub> (concentração final), uma alíquota do caldo é analisada por HPLC (coluna Shodex Sugar SH1011 (Showa Denko America, Inc., NY) com índice de refração de detecção (RI)) e GC (HP-Innowax, 0,25 mm X 0,2 mM X 25 m (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), com detecção por ionização de chama (FID) para o teor de isobutanol. O isobutanol é detectado.

### EXEMPLO 13

#### CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO PARA A EXPRESSÃO DO GENE DA VIA DO ISOBUTANOL EM SACCHAROMYCES CEREVISIAE

##### 10 CONSTRUÇÃO DE PLH475-Z4B8

O plasmídeo pLH475 Z4B8 (SEQ ID No. 165) foi construído para a expressão da ALS e KARI em leveduras. O pLH475 Z4B8 é um vetor pHR81 (ATCC 87541), contendo os seguintes genes quiméricos:

15 (1) o promotor CUP1 (SEQ ID No. 125), região de codificação da acetolactato sintase de *Bacillus subtilis* (alsS; SEQ ID No. 3, proteína SEQ ID No. 4) e terminator CYC1 (CYC1-2; SEQ ID No. 166);

(2) um promotor ILV5 (SEQ ID No. 167), região de codificação Pf5.IlvC Z4B8 (SEQ ID No. 168; proteína SEQ ID No. 169) e terminator ILV5 (SEQ ID No. 170), e

20 (3) o promotor FBA1 (SEQ ID No. 116), região de codificação de KARI da *S. cerevisiae* (ILV5; SEQ ID No. 37; proteína SEQ ID No. 38) e terminator CYC1.

A região de codificação Pf5.IlvC Z4B8 é uma sequência de codificação KARI derivada da *Pseudomonas fluorescens*, mas contendo 25 mutações, que foram descritas na patente US 12/337736 de propriedade comum e co-pendentes, que é incorporada no presente como referência. O KARI codificado pela Pf5.IlvC Z4B8 (SEQ ID No. 169) apresenta as seguintes mudanças de aminoácidos, em comparação com a KARI de *Pseudomonas*

*fluorescens* natural:

- 5 C33L: cisteína na posição 33 alterada para leucina,  
 R47Y: arginina na posição 47 alterada para tirosina,  
 S50A: serina na posição 50 alterada para alanina,  
 T52D: treonina na posição 52 alterada para asparagina,  
 V53A: valina na posição 53 alterada para alanina,  
 L61F: leucina na posição 61 alterada para fenilalanina,  
 T80I: treonina na posição 80 alterada para isoleucina,  
 A156V: alanina na posição 156 alterada para treonina, e  
 10 G170A: glicina na posição 170 alterada para alanina.

A região de codificação Pf5.IlvC-Z4B8 foi sintetizada pelo DNA 2.0 (Palo Alto, CA; SEQ ID No. 6) com base nos códons que foram otimizados para a expressão da *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **VETOR DE EXPRESSÃO DO PLH468**

15 O plasmídeo pLH468 (SEQ ID No. 171) foi construído para a expressão de DHAD, KivD e HADH em levedura.

As regiões de codificação para o cetisovalerato descarboxilase de *B. subtilis* (KivD) e álcool desidrogenase de fígado de cavalo (HADH) foram sintetizados por DNA 2.0 com base em códons que foram otimizados para a  
 20 expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID No. 172 e 174, respectivamente) e fornecidos em plasmídeos pKivDy DNA2.0 e pHadhy DNA 2.0. As proteínas codificadas são a SEQ ID Nos. 173 e 175, respectivamente. Os vetores de expressão individual para KivD e HADH foram construídos. Para montar o pLH467 (pRS426::P<sub>GPD1</sub>-kivDy-GPD1t), vetor pNY8 (SEQ ID No. 176;  
 25 também chamado de pRS426.GPD-ald-GPDt, descrito no pedido de patente US 2008/0182308 de propriedade comum e co-pendente, Exemplo 17, que é incorporada no presente como referência) foi digerido com as enzimas *Ascl* e *Sfil*, assim, extirpando o promotor *GPD1* e a região de codificação ald. Um

fragmento do promotor *GPD1* (*GPD1*-2; SEQ ID No. 177) a partir de pNY8 foi amplificado por PCR para adicionar um sítio *Ascl* na extremidade 5', e um sítio *SpeI* na extremidade 3', utilizando o *primer* 5' OT1068 e o *primer* 3' OT1067 (SEQ ID Nos.: 178 e 179). O fragmento do vetor pNY8 digerido por *Ascl*/*Sfil* foi  
5 ligado com o produto de PCR do promotor *GPD1* digerido com *Ascl* e *SpeI*, e o fragmento *SpeI*-*Sfil* contendo a região de codificação *kivD* otimizada por códon isolada do vetor pKivD DNA2.0. A tripla ligação gerou o vetor pLH467 (pRS426::*P<sub>GPD1</sub>-kivDy-GPD1t*). O pLH467 foi verificado através do mapeamento de restrição e sequenciamento.

10 O pLH435 (pRS425::*P<sub>GPM1</sub>-Hadhy-ADH1t*) foi obtido a partir do vetor pRS425::*GPM-sadB* (SEQ ID No. 180) que é descrito no pedido de patente US 61/058970 de propriedade comum e co-pendentes, Exemplo 3, que é incorporada no presente como referência. O pRS425::*GPM-sadB* é o vetor pRS425 (ATCC 77106) com um gene quimérico contendo o promotor *GPM1*  
15 (SEQ ID No. 135), região de codificação de uma butanol desidrogenase de *Achromobacter xylosoxidans* (*sadB*; SEQ ID No. 35; proteína SEQ ID No. 36: descritos no pedido de patente US 61/048291 de propriedade comum e co-pendente) e terminator *ADH1* (SEQ ID No.. 126). O pRS425::*GPMp-sadB* contém sítios *BbvI* e *PacI* nas extremidades 5' e 3' da região de codificação  
20 *sadB*, respectivamente. Um sítio *NheI* foi adicionado na extremidade 5' da região de codificação *sadB* por mutagênese sítio dirigida utilizando os *primers* OT1074 e OT1075 (SEQ ID No. 181 e 182) para gerar os vetores pRS425-*GPMp-sadB-NheI*, que foi verificado por sequenciamento. O pRS425::*P<sub>GPM1</sub>-sadB-NheI* foi digerido com *NheI* e *PacI* para abandonar a região de  
25 codificação *sadB*, e ligado com o fragmento *NheI-PacI* contendo a região de codificação do códon otimizado HADH do vetor pHadhy DNA2.0 para criar pLH435.

Para combinar *KivD* e os cassetes de expressão HADH em um

único vetor, o vetor de levedura pRS411 (ATCC 87474) foi digerido com *SacI* e *NotI*, e ligado com o fragmento *SacI-Sall* de pLH467 que contém o cassete  $P_{GPD1}$ -*kivDy*-*GPD1t* juntamente com o fragmento *Sall - NotI* de pLH435 que contém o cassete  $P_{GPM1}$ -*Hadhy*-*ADH1t* em uma reação de ligação tripla. Isto gerou o vetor pRS411:: $P_{GPD1}$ -*kivDy*- $P_{GPM1}$ -*Hadhy* (pLH441), que foi verificado através do mapeamento de restrição.

A fim de gerar um vetor de coexpressão para os três genes na menor via do isobutanol: *ilvD*, *kivDy* e *Hadhy*, foi utilizado o pRS423 FBA *ilvD* (Strep) (SEQ ID No. 183), que é descrito no pedido de patente US 61/100792 de propriedade comum e co-pendente, como a origem do gene *ilvD*. Este vetor de transporte contém uma origem de replicação F1 (nt 1423 a 1879) para a manutenção em *E. coli* e uma origem de 2 microns (NT 8082 a 9426) para a replicação da levedura. O vetor contém um promotor FBA (nt 2111 a 3108; SEQ ID No. 10) e um terminator FBA (nt 4861 a 5860; SEQ ID No. 184). Além disso, carrega o marcador His (nt 504 a 1163) para a seleção em levedura e marcador de resistência a ampicilina (nt 7092 a 7949) para a seleção em *E. coli*. A região de codificação *ilvD* (nt 3116 a 4828; SEQ ID No. 185; proteína SEQ ID No. 186) a partir de *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC 700610) está entre o promotor FBA e o terminador FBA formando um gene quimérico para expressão. Além disso, existe uma tag lumio fundido à região de codificação *ilvD* (nt 4829 a 4849).

A primeira etapa foi para linearizar o pRS423 FBA *ilvD* (Strep) (também chamado pRS423-FBA (*SpeI*)-*ilvD* (*Streptococcus mutans*)-Lumio) com *SacI* e *SacII* (com sítio *SacII* de extremidade cega utilizando a DNA polimerase T4), para fornecer um vetor de comprimento total de 9.482 pb. A segunda etapa foi isolar o cassete *kivDy*-*hADHy* de pLH441 com *SacI* e *KpnI* (com o sítio *KpnI* de extremidade cega com a DNA polimerase T4), que fornece um fragmento de 6063. Este fragmento foi ligado com o fragmento do vetor

pRS423-FBA (Spel)-IIVD de 9482 bp (*Streptococcus mutans*)-Lumio. Isto gerou o vetor pLH468 (pRS423::P<sub>FBA1</sub>-IIVD (Strep) Lumio-FBA1t-P<sub>GPD1</sub>-kivDy-GPD1t-P<sub>GPM1</sub>-hadhy-ADH1t), que foi confirmado por mapeamento de restrição e sequenciamento.

5

#### EXEMPLO 14

##### INATIVAÇÃO GÊNICA DA PIRUVATO DESCARBOXILASE

Este exemplo descreve a inativação de inserção dos genes endógenos PDC1, PDC5 e PDC6 de *S. cerevisiae*. Os genes PDC1, PDC5 e PDC6 codificam as três principais isoenzimas do piruvato descarboxilase. A cepa de inativação do PDC resultante foi utilizada como um hospedeiro para os vetores de expressão pLH475-Z4B8 e pLH468 que foram descritos no Exemplo 13.

##### CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INTEGRAÇÃO PDC6:: GPM1-SADB E DELEÇÃO DE PDC6

Um cassete de integração pdc6::GPM1p-sadB-ADH1t-URA3r foi produzido juntando o segmento *GPM-sadB-ADH1t* (SEQ ID No. 187) do pRS425::GPM-sadB (descrito acima) com o gene URA3r de pUC19-URA3r. O pUC19-URA3r (SEQ ID No. 188) contém o marcador URA3 do pRS426 (ATCC 77107) flanquado por sequências de repetição homólogas de 75 pb para permitir a recombinação homóloga *in vivo* e a remoção do marcador de URA3. Os dois segmentos de DNA foram juntados pela SOE PCR (conforme descrito por Horton *et al.*, (1989) *Gene* 77: 61 - 68.) Utilizando como modelo o pRS425::GPM-sadB e o plasmídeo de DNAs pUC19-URA3r, com a DNA polimerase Phusion (New England Inc. Biolabs, Beverly, MA; catálogo nº F-540S) e *primers* 114117-11A até 114117-11D (SEQ ID Nos.: 189, 190, 191 e 192), e 114117-13A e 114117-13B (SEQ ID NOs.: 193 e 194).

Os *primers* externos para a SOE PCR (114117-13A e 114117-13B) contendo regiões 5' e 3' de cerca de 50 bp homólogas às regiões

*upstream* e *downstream* do promotor e terminador *PDC6*, respectivamente. O fragmento de PCR de cassete completo foi transformado em BY4700 (ATCC 200866) e os transformantes foram mantidos nos meios sintéticos completos sem uracila e suplementados com 2% de glicose a 30° C utilizando técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202). Os transformantes foram analisados por PCR utilizando os *primers* 112590-34G e 112590-34H (SEQ ID Nos.: 195 e 196) e 112590-34F e 112590-49E (SEQ ID Nos.: 113 e 197) para verificar a integração no *locus PDC6* com a deleção da região de codificação *PDC6*. O marcador de *URA3r* foi reciclado por plaqueamento em meios sintéticos completos, suplementados com 2% de glicose e 5-FOA a 30° C seguindo os protocolos padrão. A remoção dos marcadores foi confirmada por colônias colocadas nas placas 5-FOA em meio SD-URA para verificar a ausência de crescimento. A cepa resultante identificada possui o genótipo:

15 BY4700 *pdcc6::P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t*.

#### **CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INTEGRAÇÃO *PDC1::PDC1-ILVD* E DELEÇÃO DE *PDC1***

Um cassete de integração *pdcc1::PDC1p-ilvD-FBA1t-URA3r* foi produzido juntando o segmento *ilvD-FBA1t* (SEQ ID No. 198) a partir de pLH468 (descrito acima) ao gene *URA3r* a partir de pUC19-URA3r pela SOE PCR (conforme descrito por Horton *et al.*, (1989) *Gene* 77:61-68), utilizando como modelo os DNAs plasmidiais pLH468 e pUC19-URA3r, com a DNA polimerase Phusion (New England Biolabs Inc., Beverly, MA;.. catálogo nº F-540S) e os *primers* 114117-27A atpe 114117-27D (SEQ ID Nos.: 199, 200, 201 e 202).

25

Os *primers* externos para a SOE PCR (114117-27A e 114117-27D) continha regiões 5' e 3' de cerca de 50 bp homólogas às regiões *downstream* do promotor *PDC1* e *downstream* da sequência de codificação

*PDC1*. O fragmento de PCR de cassete completo foi transformado em BY4700 *pdc6::P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t* e os transformantes foram mantidos em meios sintéticos completos sem uracila e suplementados com 2% de glicose a 30° C utilizando técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202). Os transformantes foram analisados por PCR utilizando os *primers* 114117-36D e 135 (SEQ ID NOs 203 e 204), e os *primers* 112590-49E e 112590-30F (SEQ ID NOs 197 e 205) para verificar a integração no *locus PDC1* com a deleção da sequência de codificação de *PDC1*. O marcador de URA3r foi reciclado por plaqueamento em meios sintéticos completos suplementados com 2% de glicose e 5-FOA, a 30° C seguindo os protocolos padrão. A remoção dos marcadores foi confirmada ao colocar colônias nas placas 5-FOA sobre o meio SD-URA para verificar a ausência de crescimento. A cepa identificada resultante "NYLA67" apresenta o genótipo: BY4700 *pdc6::GPM1p-sadB-ADH1t* *pdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t*.

### DELEÇÃO DE HIS3

Para deletar a região de codificação endógena *HIS3*, um cassete *his3::URA3r2* foi amplificado por PCR a partir de um molde de DNA URA3r2 (SEQ ID No. 206). O URA3r2 contém o marcador de URA3 a partir do pRS426 (ATCC 77107) flanquado por sequências repetidas homólogas de 500 pb para permitir a recombinação homóloga *in vivo* e a remoção do marcador URA3. A PCR foi realizada utilizando a DNA polimerase Phusion e os *primers* 114117-45A e 114117-45B (SEQ ID Nos.: 207 e 208) que geraram um produto de PCR de cerca de 2,3 kb. A porção *HIS3* de cada *primer* foi derivada da região 5' *upstream* do promotor *HIS3* e da região 3' *downstream* da região de codificação de tal forma que a integração do marcador de URA3r2 resulta na substituição da região de codificação *HIS3*. O produto de PCR foi transformado em NYLA67 utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast*

*Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202) e os transformantes foram selecionados em meios sintéticos completos sem uracila e suplementados com 2% de glicose a 30° C. Os transformantes foram selecionados para verificar a correta integração ao replicar o plaqueamento de transformantes em meios sintéticos completos sem histidina e suplementados com 2% de glicose a 30° C. O marcador de URA3r foi reciclado por plaqueamento em meios sintéticos completos suplementados com 2% de glicose e 5-FOA, a 30° C seguindo os protocolos padrão. A remoção dos marcadores foi confirmada ao colocar as colônias das placas 5-FOA sobre os meios SD-URA para verificar a ausência de crescimento. A cepa resultante identificada "NYLA73" apresenta o genótipo: BY4700 *pdc6::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δhis3*.

#### **CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE INTEGRAÇÃO PDC5::KANMX E DELEÇÃO DO PDC5**

Um cassete *pdc5::kanMX4* foi amplificado por PCR a partir da cepa YLR134W de DNA cromossômico (ATCC nº 4034091) utilizando a DNA polimerase Phusion e os *primers* PDC5::KanMXF e PDC5::KanMXR (SEQ ID Nos.: 106 e 107) que gerou um produto de PCR de cerca de 2,2 kb. A porção PDC5 de cada *primer* foi derivada da região 5' *upstream* do promotor PDC5 e da região 3' *downstream* da região de codificação, de tal forma que a integração do marcador de kanMX4 resulta na substituição da região de codificação PDC5. O produto da PCR foi transformado em NYLA73 utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, págs. 201 - 202), e os transformantes foram selecionados em meio YP suplementado com 1% de etanol e geneticina (200 µg/mL) a 30° C. Os transformantes foram selecionados por PCR para verificar a correta integração no *locus* PDC com a substituição da região de codificação PDC5 utilizando os *primers* PDC5kofof e N175 (SEQ ID Nos.: 108 e 109). Os transformantes de identificação correta apresenta o

genótipo: BY4700 *pdc6::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δhis3 pdc5::kanMX4*.

Os vetores do plasmídeo pLH468 e pLH475-Z4B8 foram transformados em simultâneo na cepa BY4700 *pdc6::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δhis3 pdc5::kanMX4* utilizando as técnicas genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratório de Imprensa, o Cold Spring Harbor, NY) e a cepa resultante foi mantida em meio sintético completo sem histidina e uracila e suplementada com etanol 1% a 30° C. A cepa resultante foi denominada NGI-049.

#### EXEMPLO 15

#### PRODUÇÃO DO ISOBUTANOL PELA CEPA NGI-049 DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Uma cultura de sementes de NGI-049 para a preparação do inóculo foi cultivada em Base de Nitrogênio de Levedura (*Yeast Nitrogen Base - YNB*) sem meio de aminoácidos (6,7 g/L), suplementada com uma mistura de saída de aminoácidos (1,4 g/L), leucina (100 mg/L) e triptofano (20 mg/L). O etanol a 1% (v/v) foi utilizado como única fonte de carbono para as culturas de sementes. O meio de fermentação era um meio semi-sintético, cuja composição é dada na Tabela 7.

#### TABELA 7

#### COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

Ingrediente	Quantidade/L
1. YNB sem aminoácidos <sup>a</sup>	6,7 g
2. Mistura Sigma de saída (Y2001) <sup>b</sup>	2,8 g
3. Leucina (10 g/L)	20 mL
4. Triptofano (10 g/L)	4 mL
5. Etanol	10 mL
6. Glicose 50% em peso do estoque	4 g

<sup>a</sup> Obtido pela BD Diagnostic Systems, Sparks,

<sup>b</sup> Obtido pela Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Os ingredientes de 1 a 4 da Tabela 7 foram adicionados à água na concentração prescrita para perfazer um volume final de 0,54 L no fermentador. O conteúdo do fermentador foi esterilizado em autoclave. Os componentes 5 e 6 foram misturados, esterilizados em filtro e adicionados ao fermentador, após o meio autoclavado esfriar. O volume total final do meio de fermentação (na fase aquosa) era de cerca de 0,54 L.

A fermentação foi realizada utilizando um biorreator de 1 L autoclavável, Bio Console ADI 1025 (Applikon, Inc, Holanda) com um volume útil de 900 mL. A temperatura foi mantida a 30° C durante toda a fermentação e o pH foi mantido em 5,5, com hidróxido de sódio. Após a inoculação do meio de fermentação estéril com a cultura de sementes (10% vol), o fermentador foi operado em condições aeróbias a 30% de oxigênio dissolvido (DO) do ponto de ajuste com 0,3 vvm de fluxo de ar através do controle automático da taxa de agitação (rpm). Uma vez que a batelada inicial de glicose de 2 g/L foi consumida, a glicose foi alimentada através de uma bomba em uma taxa exponencial, tal que a glicose nunca acumula acima de 0,2 g/L no fermentador. Uma vez que a densidade óptica desejada ( $OD_{600}$ ) foi atingida (ou seja,  $OD_{600} = 6$ ), a cultura foi induzida para a fase de produção de isobutanol pela alimentação de glicose de forma que o excesso de glicose ( $> 2$  g/L) foi mantido em todos os momentos durante a fermentação. Duas horas após o excesso de glicose, 60 mL de solução estoque 10X de Extrato de Levedura Peptona (*Yeast Extract Peptone*) de filtro esterilizado (YEP 10X = 100 g/L de extrato de levedura e 200 g/L de peptona) foi adicionado. A glicose foi alimentada (50% em peso de solução estoque) para o fermentador para manter os níveis de glicose superiores a 2 g/L.

Como a produção eficiente de isobutanol requer condições de

microaerofilia para permitir o equilíbrio redox na via de biossíntese, o ar era fornecido continuamente ao fermentador a 0,3 vvm. A aeração prolongada levou à remoção significativa de isobutanol da fase aquosa do fermentador. Para quantificar a perda de isobutanol, devido ao esgotamento, o gás de escape do fermentador foi enviado diretamente para um espectrômetro de massa (espectrômetro de massa Prima dB, Thermo Electron Corporation, Madison, WI) para quantificar a quantidade de isobutanol no fluxo de gás. O isobutanol atinge seu pico na massa para as proporções de carga de 74 ou 42 foram monitorados continuamente para quantificar a quantidade de isobutanol no fluxo de gás.

A glicose e os ácidos orgânicos na fase aquosa foram monitorados durante a fermentação, utilizando o HPLC. A glicose também foi monitorada rapidamente utilizando um analisador de glicose (YSI, Inc., Yellow Springs, OH). O isobutanol na fase aquosa foi quantificado por HPLA conforme descrito nos Métodos Gerais acima, após a fase aquosa ter sido removida periodicamente do fermentador. Para a produção de isobutanol, o título eficaz, a taxa efetiva e o rendimento efetivo, todos corrigidos para o isobutanol perdido devido ao esgotamento, foram de 3 g/L, 0,04 g/L/h e 0,16 g/g, respectivamente.

### REIVINDICAÇÕES

1. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo localizado no citosol possuindo atividade de acetolactato sintase, em que a célula de levedura é substancialmente livre de uma enzima possuindo atividade de piruvato descarboxilase e em que a célula converte piruvato em acetolactato.

2. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a conversão de piruvato em acetolactato é de pelo menos cerca de 60% do rendimento teórico.

3. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um equilíbrio em equivalentes redutores, em que a conversão de piruvato em acetolactato é de pelo menos cerca de 86% do rendimento teórico.

4. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende interrupção em pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo possuindo atividade de piruvato descarboxilase ou uma interrupção em pelo menos um gene que codifica um elemento regulador que controla a expressão do gene piruvato descarboxilase.

5. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a levedura é selecionada a partir do grupo que consiste em *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* e *Pichia*.

6. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo possuindo atividade de piruvato descarboxilase é selecionado a partir do grupo que consiste em PDC1, PDC2, PDC5 e PDC6.

7. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que:

(a) PDC1 é codificado por um gene que codifica um polipeptídeo possuindo pelo menos 80% de identidade com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID No. 51 e 59;

(b) PDC2 é codificado por um gene que codifica um polipeptídeo possuindo pelo menos 80% de identidade com uma sequência conforme descrita na SEQ ID No. 61;

(c) PDC5 é codificado por um gene que codifica um polipeptídeo possuindo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID No. 53; e

(d) PDC6 é codificado por um gene que codifica um polipeptídeo possuindo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID No. 55;

em que identidade de 80% de (a) - (c) está baseada no método de alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros padrão de GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e séries Gonnet 250 de matriz de peso proteico.

8. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo possuindo atividade de piruvato descarboxilase codifica um polipeptídeo com pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID No. 63, 65 e 67, em que a identidade de 80% está baseada no método de alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros padrão de GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e séries Gonnet 250 de matriz de peso proteico.

9. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo possuindo atividade de acetolactato sintase é definido pelo Número da Comissão de Enzimas EC 2.2.1.6.

10. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo possuindo atividade de acetolactato sintase apresenta uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nos. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18, com base no método de alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros padrão de GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e séries Gonnet 250 de matriz de peso proteico.

11. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser substancialmente livre de um complexo enzimático possuindo atividade de piruvato desidrogenase.

12. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o complexo enzimático possuindo atividade de piruvato desidrogenase é definido pelo Número da Comissão de Enzimas EC 1.2.4.1.

13. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de compreender interrupção em pelo menos um gene que codifica uma proteína de um complexo multienzimático de piruvato desidrogenase que compreende as seguintes proteínas: PDA1, PDB1, Lat1, Lpd1 e Pdx1.

14. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende uma interrupção em um gene que codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em:

(a) um polipeptídeo PDA1 possuindo pelo menos 80% de identidade com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em: SEQ ID No. 83; SEQ ID No. 93 e SEQ ID No. 99;

(b) um polipeptídeo PDAB1 possuindo pelo menos 80% de

identidade com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em:  
SEQ ID No. 85; SEQ ID No. 95 e SEQ ID No. 101;

(c) um polipeptídeo LAT1 possuindo pelo menos 80% de  
identidade com a SEQ ID No. 87;

5 (d) um polipeptídeo LPD1 possuindo pelo menos 80% de  
identidade com a SEQ ID No. 89;

(e) um polipeptídeo PDX1 possuindo pelo menos 80% de  
identidade com a SEQ ID No. 91;

em que a identidade de 80% está baseada no método de  
10 alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros padrão de GAP PENALTY =  
10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e séries Gonnet 250 de matriz de peso  
proteico.

15 15. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo  
com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende uma  
interrupção em um gene que codifica um polipeptídeo possuindo pelo menos  
80% de identidade com uma sequência conforme definida na SEQ ID No. 97,  
com base no método de alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros  
padrão de GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e séries  
Gonnet 250 de matriz de peso proteico.

20 16. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo  
com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser substancialmente livre de  
uma enzima possuindo atividade de glicerol-3-fosfato desidrogenase  
dependente de NAD.

25 17. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo  
com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que compreende interrupção  
em pelo menos um gene que codifica uma glicerol-3-fosfato desidrogenase  
dependente de NAD compreendendo as seguintes proteínas: GPD1 e GPD2.

18. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo

com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que compreende uma interrupção em um gene que codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em:

(a) um polipeptídeo GPD1 possuindo pelo menos 80% de  
5 identidade com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em:  
SEQ ID No. 69, 73 e 79;

(b) um polipeptídeo GPD2 possuindo pelo menos 80% de  
identidade com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em:  
SEQ ID No. 71, 75 e 81;

10 em que a identidade de 80% está baseada no método de  
alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros padrão de GAP PENALTY =  
10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e séries Gonnet 250 de matriz de peso  
proteico.

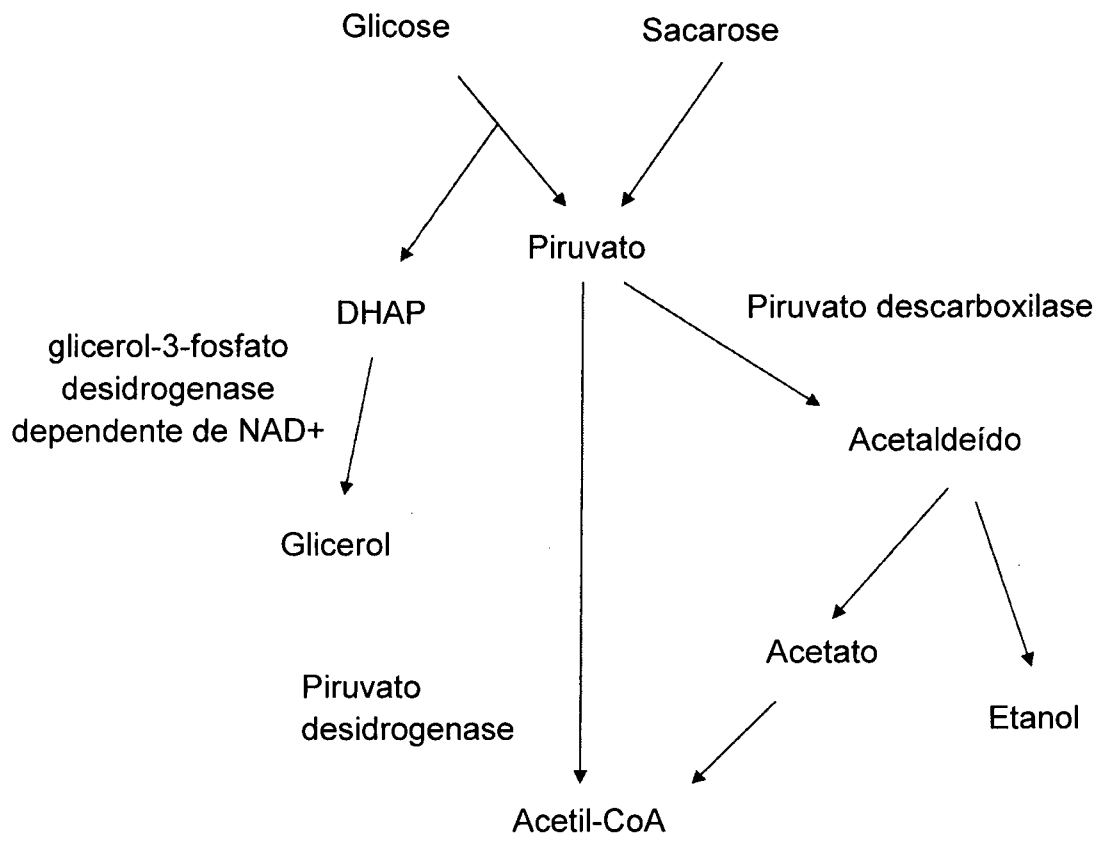
19. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, de acordo  
15 com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que compreende uma  
interrupção em um gene que codifica um polipeptídeo possuindo pelo menos  
80% de identidade com uma sequência conforme descrita na SEQ ID No. 77,  
com base no método de alinhamento Clustal W utilizando os parâmetros  
padrão de GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0,1 e séries  
20 Gonnet 250 de matriz de peso proteico.

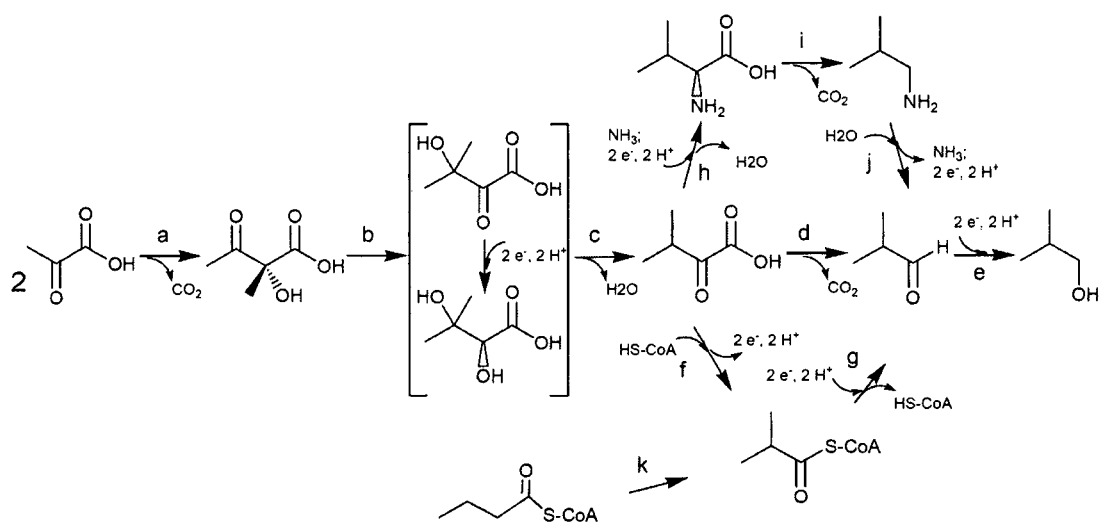
20. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, caracterizada  
pelo fato de que compreende pelo menos um gene que codifica um  
polipeptídeo localizado no citosol possuindo atividade de acetolactato sintase,  
em que a célula de levedura é substancialmente livre de um complexo  
25 enzimático possuindo atividade de piruvato descarboxilase, e em que a célula  
converte piruvato em acetolactato, em que a levedura produz um produto  
selecionado a partir do grupo que consiste em: isobutanol, 2-butanol, 1-butanol,  
2-butanona, valina, leucina e álcool isoamílico, e em que conversão de piruvato

em acetolactato é de pelo menos cerca de 60% do rendimento teórico.

21. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO, selecionado a partir do grupo que consiste em: isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, valina, leucina e álcool isoamílico, caracterizado pelo fato de que  
5 compreende o cultivo da célula de levedura recombinante conforme definida na reivindicação 20, em condições em que o produto é produzido e, opcionalmente, a recuperação do produto.

22. CÉLULA DE LEVEDURA RECOMBINANTE, conforme definida na reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que compreende ainda  
10 atividade de piruvato desidrogenase reduzida.

**Fig. 1**



**Fig. 2**

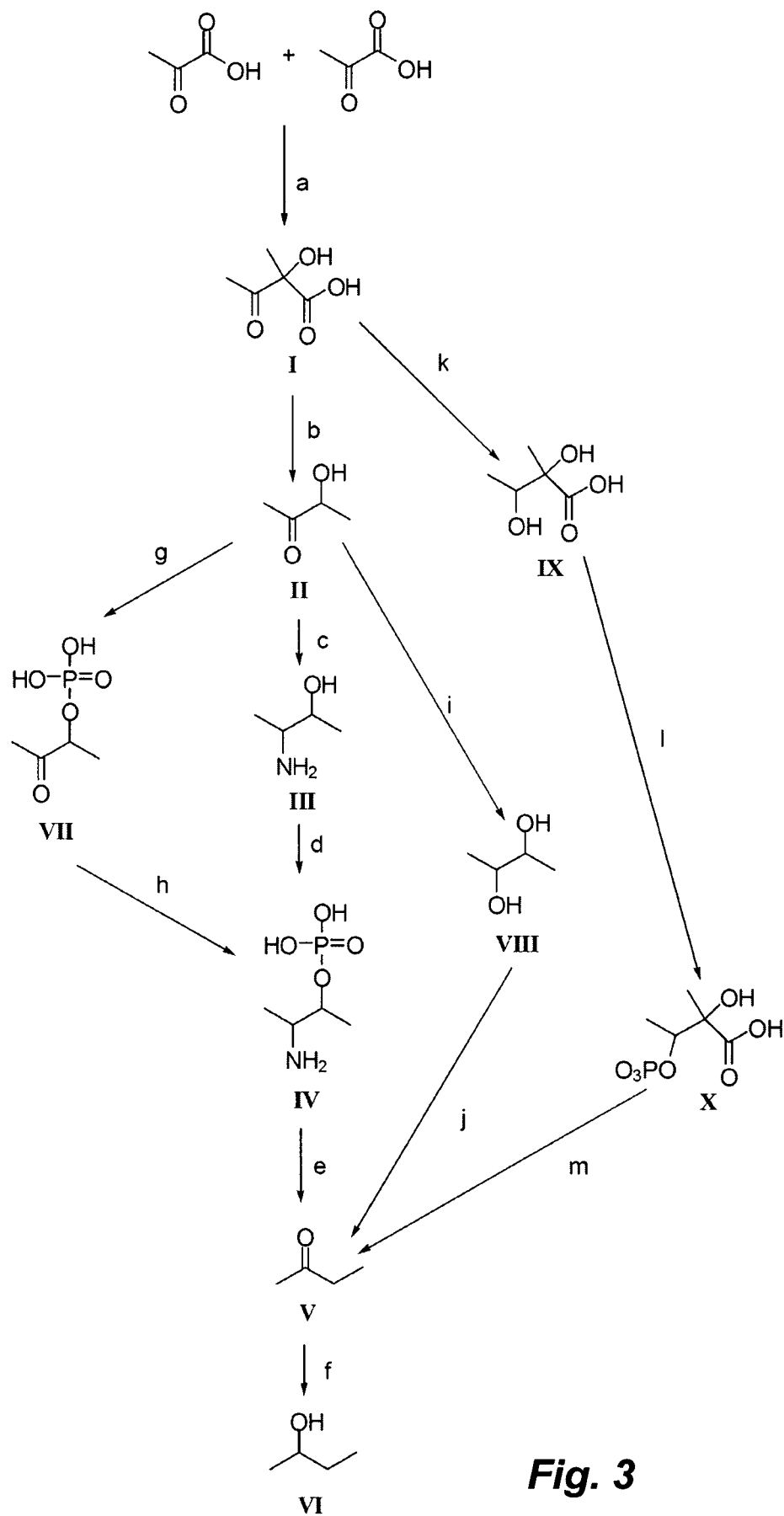


Fig. 3

us cereus AH1134  
 us cereus ATCC 14579  
 us cereus G9842  
 us thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646  
 us cereus O3BB108  
 us cereus NUH0597-99  
 us thuringiensis str. Al Hakam  
 us anthracis str. Ames  
 us cereus W  
 us cereus AH187  
 Bacillus weihenstephanensis KBAB4

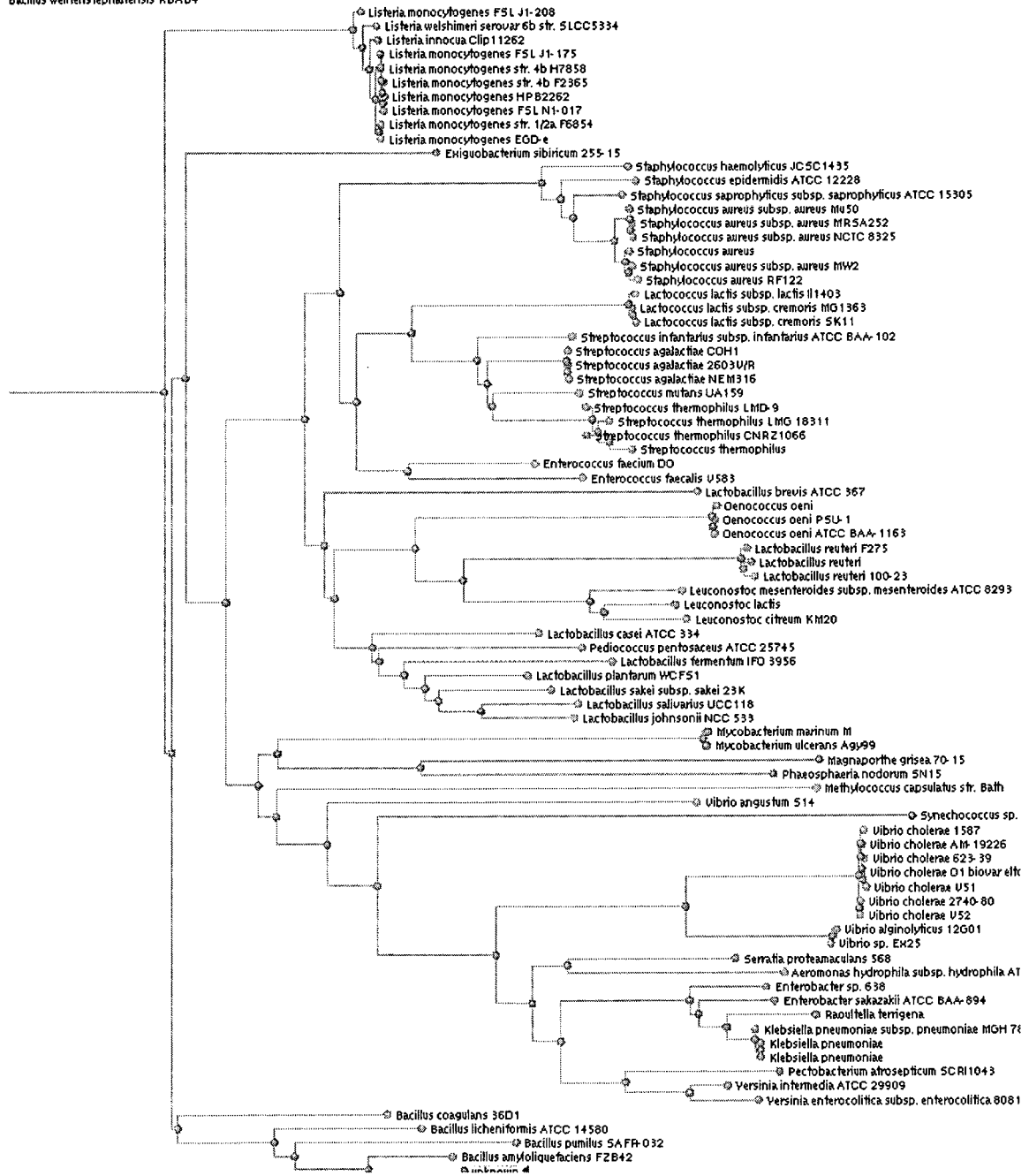


Fig. 4

**RESUMO****“CÉLULAS DE LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA A  
PRODUÇÃO DE UM PRODUTO”**

A presente invenção refere-se a um alto fluxo na conversão de  
5 piruvato em acetolactato que foi atingido em levedura através da expressão de  
acetolactato sintase no citosol em conjunto com redução na atividade da  
piruvato descarboxilase. Manipulações adicionais para melhorar o fluxo para  
acetolactato são a atividade reduzida da piruvato desidrogenase e a atividade  
reduzida da glicerol-3-fosfato desidrogenase. A produção de compostos  
10 possuindo acetolactato como um intermediário *upstream* beneficia-se da  
conversão aumentada de piruvato em acetolactato nas cepas descritas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

**Código de Controle**

Campo 1



A64337213FE70862

Campo 2



B00520443D8B54D6

**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 2012 06 04\_0153-2949\_Sequence Listing\_JSP\_HEM.txt
- Data de Geração do Código: 04-06-2012
- Hora de Geração do Código: 09:36:03
- Código de Controle:
  - Campo 1: A64337213FE70862
  - Campo 2: B00520443D8B54D6