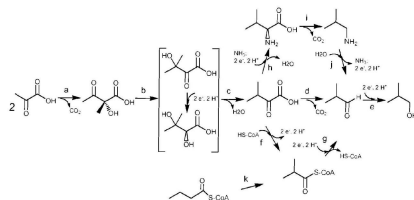


\* B R 1 1 2 0 1 3 0 2 4 3 2 8 A 2 \*

**(43) Data da Publicação Nacional: 25/08/2020**

**(57) Resumo:** CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUIR ISOBUTANOL E POLIPEPTÍDEO Trata-se de células hospedeiras de levedura recombinantes e métodos para o seu uso para a produção de isobutanol. As células hospedeiras de levedura fornecidas compreendem uma via biossintética de isobutanol e pelo menos um dentre atividade de aldeído desidrogenase reduzida ou eliminada, atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada; ou um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de cetoalcoo redutase isomerase.



## **“CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR ISOBUTANOL E POLIPEPTÍDEO”**

### **DIREITOS DE LICENÇA DO GOVERNO**

[001] Esta invenção foi feita com o apoio do governo sob Contrato DE-AR0000006 outorgado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos. O Governo tem determinados direitos sobre esta invenção.

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[002] A invenção se refere a células hospedeiras recombinantes e métodos para produção fermentativa de isobutanol.

### **REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS**

[003] Este pedido reivindica prioridade sob 35 U.S.C. § 119(e) ao Pedido de nº U.S. 61/472.484 (depositado em 6 de abril de 2011), U.S. 61/467.261 (depositado em 24 de março de 2011), U.S. 61/472.487 (depositado em 6 de abril de 2011), U.S. 61/467.271 (depositado em 24 de março de 2011), U.S. 61/570.513 (depositado em 14 de dezembro de 2011), U.S. 61/467.249 (depositado em 24 de março de 2011), U.S. 61/472.497 (depositado em 6 de abril de 2011) e U.S. 61/472.474 (depositado em 6 de abril de 2011), sendo cada um dos quais incorporado ao presente documento a título de referência em sua integridade.

### **REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIA SUBMETIDA ELETRONICAMENTE POR MEIO DE EFS-REDE**

[004] O teor da listagem de sequência eletronicamente submetida (Nome: 20120323\_CL5367USNA\_SEQLIST.txt; Tamanho 2.003.893 bytes; Data de Criação 23 de março de 2012) está incorporado ao presente documento a título de referência em sua integridade.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[005] O butanol é um importante produto químico industrial, útil como um aditivo de combustível, como um produto químico de matéria-prima



na indústria de plástico e como um agente de extração de grau alimentício na indústria de alimentos e sabor. A cada ano, 4,5 a 5,4 bilhões de quilos (10 a 12 bilhões de libras) de butanol são produzidos por meios petroquímicos, e a necessidade desse produto químico provavelmente aumentará no futuro.

[006] Os métodos para a síntese química de isobutanol são conhecidos, tais como oxo-síntese, hidrogenação catalítica de monóxido de carbono (*Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6<sup>o</sup> Edição, 2003, Wiley-VCH Verlag GmbH e Co., Weinheim, Alemanha, Vol. 5, pp. 716-719) e condensação Guerbet de metanol com n-propanol (Carlini *et al.*, *J. Molec. Catal. A. Chem.* 220:215-220, 2004). Esses processos usam materiais de iniciação derivados de produtos petroquímicos, são geralmente caros e não são ecológicos. A produção de isobutanol dos materiais brutos derivados de planta minimizariam emissões de gás de efeito estufa e representariam um avanço na técnica.

[007] O isobutanol é produzido biologicamente como um subproduto de fermentação de levedura. O mesmo é um componente de "óleo fúsel" que se forma como um resultado do metabolismo incompleto de aminoácidos por fungos. O isobutanol é especificamente produzido a partir do catabolismo de L-valina. Depois que o grupo de amina de L-valina é revestido como uma fonte de nitrogênio, o ácido  $\alpha$ -queto resultante é decarboxilado e reduzido a isobutanol por meio de enzimas da denominada Via Ehrlich (Dickinson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273:25752-25756, 1998).

[008] Os aprimoramentos e alternativas para a biossíntese de butanol diretamente a partir de açúcares aprimoraria a viabilidade econômica e representaria um avanço na técnica.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

[009] São fornecidas no presente documento células hospedeiras recombinantes de levedura e métodos para a produção de isobutanol.

[010] Em algumas realizações, uma célula hospedeira recombinante compreende uma via projetada de produção de isobutanol e (a) pelo menos um dentre (i) um polipeptídeo heterólogo com atividade de cetol-ácido redutoisomerase (KARI) selecionada dentre o grupo que consistem em (1) um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 90% de identidade com uma enzima KARI derivada de *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium beijerinckii* ou *Anaerostipes caccae* ou um fragmento ativo do mesmo (2) um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade com SEQ ID NO: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 ou 65; ou (ii) um polinucleotídeo heterólogo que codifica o polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI DE (a); e (b) pelo menos uma modificação de célula hospedeira que intensifica o desempenho da via projetada de produção de isobutanol. Em algumas realizações, a combinação de resultados de (a) e (b) é um aumento sinérgico no desempenho de via de produção de isobutanol.

[011] Em algumas realizações, uma célula hospedeira recombinante compreende uma via biossintética de isobutanol e (a) um polipeptídeo heterólogo com atividade de cetol-ácido redutoisomerase (KARI) selecionado dentre o grupo que consiste em (i) um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 90% de identidade com uma enzima KARI derivada dentre *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium beijerinckii* ou *Anaerostipes caccae* ou um fragmento ativo dos mesmos, (ii) um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade com SEQ ID NO: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 ou 65, (iii) um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade com uma enzima KARI derivada de *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Enterococcus gallinarum*,

*Streptococcus thermophiles*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium beijerinckii*, *Anaerostipes caccae* ou *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 ou um fragmento ativo dos mesmos, em que o polipeptídeo tem um  $K_M$  para NADH de menos do que cerca de 50, (iv) um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade com uma enzima KARI derivada de *Staphylococcus capitis* SK14, *Staphylococcus epidermidis* M23864-W1, *Staphylococcus horminis* SK119, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* TCH130, *Staphylococcus warneri* L37603, *Staphylococcus epidermidis* W23144, *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *Saprophyticus* ATCC15305, *Staphylococcus carnosus* subsp. *Carnosus* TM300, *Listeria monocytogenes* EGD-e, *Listeria grayi* DSM 20601, *Enterococcus casseliflavus* EC30, *Enterococcus gallinarum* EG2, *Macrococcus caseolyticus* JCSC5402, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus gordonii* str. *cgakkus* sybstr. CH1, *Streptococcus suis* 89/1591, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* ATCCBAA-102, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC8293, *LactoBacillus buchneh* ATCC11577, *Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Streptococcus pneumoniae* CGSP14, *Streptococcus pneumoniae* TIGR4, *Streptococcus sanguinis* SK36, *Streptococcus salivarius* SK126, *Streptococcus thermophilus* LMD-9, *Streptococcus pneumoniae* CCRI 1974M2, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 111403, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ATCC19254, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *LactoBacillus brevis* subsp. *gravesensis* ATCC27305 ou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCD02118 ou um fragmento ativo dos mesmos, em que o polipeptídeo heterólogo tem um  $K_M$  para NADH de menos do que cerca de 50, (v) um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI que tem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade com

SEQ ID NO: 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133 ou 135 ou um fragmento ativo dos mesmos, em que o polipeptídeo heterólogo tem um  $K_M$  para NADH de menos do que cerca de 50; (b) um polinucleotídeo heterólogo que codifica o polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI de (a); (c) atividade de desidrogenase de aldeído reduzida ou eliminada; (d) atividade de aldeído oxidase reduzida ou eliminada; (e) atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada; ou (f) uma combinação dos mesmos.

[012] Em uma realização, a célula hospedeira recombinante compreende atividade de expressão de desidrogenase de aldeído reduzida ou eliminada e expressão ou atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada.

[013] Em outra realização, a célula hospedeira recombinante compreende (i) expressão ou atividade de desidrogenase de aldeído reduzida ou eliminada ou expressão ou atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada e (ii) um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de KARI e  $K_M$  para NADH de menos do que 300  $\mu M$ .

[014] Em outra realização, o hospedeiro recombinante compreende um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI que tem pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95% de identidade com SEQ ID NO: 27, 29, 141, 143, 275 ou 277.

[015] Em algumas realizações, a célula hospedeira recombinante compreende um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI que compreende substituições em aminoácidos que correspondem a S56 e S58 de SEQ ID NO: 27. Em algumas realizações, o polipeptídeo com atividade de KARI compreende adicionalmente uma substituição de um ou mais dentre os aminoácidos que correspondem a 186, N87, T131 ou T191 de SEQ ID NO: 27.

Em algumas realizações, o polipeptídeo com atividade de KARI que tem pelo menos 90% de identidade ou pelo menos 95% de identidade com SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 ou 65.

[016] Em algumas realizações, a célula hospedeira recombinante tem uma produtividade eficaz de isobutanol de pelo menos cerca de 3, pelo menos cerca de 4 ou pelo menos cerca de 5 gramas por grama de células depois de cerca de 48 horas, em que pelo menos as últimas cerca de 24 das 48 horas estão sob condições anaeróbicas.

[017] Em algumas realizações, a célula hospedeira recombinante compreende um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI que tem um  $K_M$  para NADH de menos do que cerca de 350, menos do que cerca de 100, menos do que cerca de 50 ou menos do que cerca de 10  $\mu M$  em pH 6,8.

[018] Em algumas realizações, a célula hospedeira recombinante compreende um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI que tem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade com SEQ ID NO: 376, 382, 378 ou 275.

[019] Em algumas realizações, a célula hospedeira recombinante compreende um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI compreende uma substituição de amino ácido em um ou mais das posições que correspondem aos aminoácidos A41, S56, S58, I87, T131, T191, R227 ou Q246 de uma enzima KARI derivada de *Anaerostipes caccae* (SEQ ID NO:27).

[020] Em algumas realizações, a célula hospedeira recombinante compreende um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI que compreende SEQ ID NO: 33 ou SEQ ID NO: 35 ou um fragmento ativo dos mesmos.

[021] Em outra realização, a célula hospedeira recombinante compreende uma deleção, mutação, e/ou substituição em um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem atividade de desidrogenase de

aldeído. Em algumas realizações, o polipeptídeo que tem atividade de desidrogenase de aldeído catalisa a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico. Em algumas realizações, o polipeptídeo que tem atividade de desidrogenase de aldeído corresponde ao Número de Comissão de Enzima EC 1.21.3, EC 1.2.1.4, e/ou EC1.2.1 .5. Em algumas realizações, a célula hospedeira é *S. cerevisiae* e o polipeptídeo que tem atividade de desidrogenase de aldeído é ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6 ou um homólogo dos mesmos. Em algumas realizações, a célula hospedeira é *K. lactis* e o polipeptídeo que tem a atividade de desidrogenase de aldeído é KLLA0F00440, KLLA0E23057, KLL.A0D10021 ou KLLA0D09999G. Em algumas realizações, a célula hospedeira é *P. stipitis* e o polipeptídeo que tem atividade de desidrogenase de aldeído é ALD2, ALD3, ALD4, ALD5 ou ALD7. Em algumas realizações, a célula hospedeira é *LactoBacillus plantarum* e o dito polipeptídeo que tem atividade de desidrogenase de aldeído é AldH. Em algumas realizações, a célula hospedeira é *E. coli* e o polipeptídeo que tem atividade de desidrogenase de aldeído é aldA, aldB ou aldH.

[022] Em outra realização, a célula hospedeira compreende uma deleção, mutação, e/ou substituição em um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem atividade de aldeído oxidase. Em algumas realizações, o polipeptídeo que tem atividade de aldeído oxidase catalisa a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico. Em algumas realizações, o polipeptídeo que tem atividade de aldeído oxidase corresponde ao Número de Comissão de Enzima EC 1.2.3.1. Em algumas realizações, o polipeptídeo que tem atividade de aldeído oxidase é AOX1 e/ou AOX2.

[023] Em outra realização, a célula hospedeira compreende uma deleção, mutação, e/ou substituição em um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem atividade de acetolactato redutase. Em algumas realizações, o polipeptídeo que tem atividade de acetolactato redutase

compreende um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo selecionado dentre o grupo que consiste em SEQ ID NO: 676, SEQ ID NO: 678, SEQ ID NO: 680, SEQ ID NO: 682, SEQ ID NO: 684, SEQ ID NO: 686, SEQ ID NO: 688, SEQ ID NO: 690, SEQ ID NO: 692, SEQ ID NO: 694, SEQ ID NO: 696, SEQ ID NO: 702, SEQ ID NO: 704, SEQ ID NO: 706, SEQ ID NO: 708, SEQ ID NO: 710, SEQ ID NO: 712, SEQ ID NO: 714, SEQ ID NO: 716, SEQ ID NO: 718, SEQ ID NO: 720, SEQ ID NO: 722, SEQ ID NO: 724, SEQ ID NO: 726, SEQ ID NO: 728 e SEQ ID NO: 730. Em algumas realizações, o polipeptídeo que tem atividade de acetolactato redutase é YMR226C.

[024] Em outra realização, a célula hospedeira recombinante é uma célula hospedeira de levedura. Em algumas realizações, a levedura é selecionada dentre o grupo que consiste em *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Issatchenkia* ou *Pichia*. Em algumas realizações, a célula hospedeira é *Saccharomyces cerevisiae*.

[025] Em outra realização, a célula hospedeira é uma célula bacteriana. Em algumas realizações, a célula bacteriana é uma célula *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *LactoBacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *PaeniBacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* ou *Streptococcus*. Em alguma realização, a célula bacteriana não é *E. coli*.

[026] Em algumas realizações, a via projetada de produção de isobutanol da célula hospedeira recombinante compreende as seguintes conversões de substrato para produto: (a) piruvato a acetolactato, (b) acetolactato a 2,3-diidroxiisovalerato, (c) 2,3-diidroxiisovalerato a 2-cetoisovalerato, (d) 2-cetoisovalerato a isobutiraldeído e (e) isobutiraldeído a isobutanol e mais de uma das conversões de substrato para produto é

catalisada por uma enzima que é heteróloga à célula hospedeira. Em algumas realizações, todas as conversões de substrato para produto são catalisadas por enzimas heterólogas à célula hospedeira. Em algumas realizações, pelo menos um polinucleotídeo heterólogo que codifica uma enzima heteróloga à célula hospedeira é cromossomicamente integrada à célula hospedeira. Em algumas realizações, as conversões de substrato para produto são catalisadas por enzimas substancialmente localizadas no citosol. Em algumas realizações, a conversão de substrato para produto para isobutiraldeído a isobutanol é catalisada por uma enzima de desidrogenase de álcool que utiliza NADH como um cofator. Em algumas realizações, a conversão de acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato é catalisada por uma KARI que pode usar NADH como um cofator.

[027] Em algumas realizações, a célula hospedeira compreende o plasmídeo pLH702 ou pLH701 ou um plasmídeo que tem as mesmas regiões de codificação. Em algumas realizações, a célula hospedeira compreende o plasmídeo pBP915 ou um plasmídeo que tem as mesmas regiões de codificação. Em algumas realizações, a célula hospedeira compreende o plasmídeo pYZ067 $\Delta$ kivD $\Delta$ hADH ou um plasmídeo que tem as mesmas regiões de codificação.

[028] Em algumas realizações, a célula hospedeira compreende capacidade reduzida, interrompida ou eliminada para converter acetolactato para 2,3-dihidroxi-2-metilbutirato.

[029] Em algumas realizações, a célula hospedeira é levedura e tem expressão ou atividade de decarboxilase de piruvato reduzida ou eliminada. Em algumas realizações, a célula hospedeira tem atividade de PDC1, PDC5 ou PDC6 reduzida ou eliminada ou uma combinação dos mesmos.



[030] Em algumas realizações, a célula hospedeira tem expressão ou atividade de desidrogenase de glicerol-3-fosfato dependente de NAD reduzida ou eliminada. Em algumas realizações, a célula hospedeira tem atividade de GPD2 reduzida.

[031] Em algumas realizações, a célula hospedeira tem expressão ou atividade de FRA2 reduzida ou eliminada.

[032] Em algumas realizações, a célula hospedeira produz isobutanol sob condições anaeróbicas e a relação molar de isobutanol para glicerol é maior do que 1.

[033] Em algumas realizações, o polipeptídeo que tem atividade de cetol-ácido redutoisomerase é compatível com o perfil HMM dado fornecido na Tabela Z com um valor HMM E de perfil de  $<10^{-3}$ .

[034] Em algumas realizações, a célula hospedeira produz isobutanol em um rendimento maior do que cerca de 25%, cerca de 50%, cerca de 75% ou cerca de 90% em rendimento teórico.

[035] Em algumas realizações, isobutanol e etanol são produzidos.

[036] Os métodos para produzir isobutanol incluem métodos que compreendem fornecer uma célula hospedeira recombinante conforme descrito acima e colocar em contato a célula hospedeira com um substrato de carbono sob condições nas quais o isobutanol é produzido. Em algumas realizações, pelo menos uma porção do contato ocorre sob condições anaeróbicas. Em algumas realizações, o contato ocorre na presença de um agente de extração. Em algumas realizações, o contato ocorre na presença de uma quantidade suficiente de agente de extração orgânico para formar um sistema de duas fases que compreende uma fase aquosa e uma fase orgânica. Em algumas realizações, um ou mais dentre a taxa eficaz, titulação eficaz ou rendimento eficaz de isobutanol é aumentada conforme comparado aos métodos que usam

uma célula hospedeira recombinante que não compreende um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI, um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo com atividade de KARI, atividade de desidrogenase de aldeído reduzida ou eliminada, atividade de aldeído oxidase reduzida ou eliminada, atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada ou uma combinação dos mesmos. Em algumas realizações, uma ou mais dentre a taxa eficaz, a titulação eficaz ou rendimento eficaz de isobutanol é aumentada conforme comparado aos métodos com uso de uma célula hospedeira recombinante que não compreende (i) um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI ou um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo com atividade de KARI e (ii) pelo menos uma modificação que intensifica o desempenho da via projetada de produção de isobutanol. Em algumas realizações, produção de DHMB, produção de ácido isobutírico ou ambas é reduzida conforme comparado aos métodos que usam uma célula hospedeira recombinante que não compreende um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI, um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo com atividade de KARI, atividade de desidrogenase de aldeído reduzida ou eliminada, atividade de aldeído oxidase reduzida ou eliminada, atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada ou uma combinação das mesmas. Em algumas realizações, a produção de DHMB, a produção de ácido isobutírico ou ambas é reduzida conforme comparado aos métodos que usam uma célula hospedeira recombinante que não compreende (i) um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI ou um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo com atividade de KARI e (ii) pelo menos uma modificação que intensifica o desempenho da via projetada de produção de isobutanol. Em algumas realizações, a relação molar de isobutanol pra glicerol é maior do que 1.

[037] Os métodos para produzir isobutanol também compreendem fornecer uma célula hospedeira recombinante que produz isobutanol e colocar em contato a célula hospedeira com um substrato de carbono sob condições nas quais o isobutanol é produzido, em que pelo menos uma porção do contato ocorre sob condições anaeróbicas e em que a relação de isobutanol para glicerol produzido é maior do que 1.

[038] Os métodos para produzir isobutanol também compreendem cultivar uma levedura recombinante que compreende uma via biossintética com capacidade de converter piruvato para acetolactato sob condições nas quais o butanol é produzido e remover o DHMB da cultura.

[039] As composições produzidas por tais métodos também são fornecidas no presente documento. Em algumas realizações, a composição compreende isobutanol e uma célula hospedeira recombinante fornecida acima. Em algumas realizações, a composição compreende butanol e não mais do que cerca de DHMB de 0,5 mM.

[040] As composições fermentativas também são fornecidas no presente documento. Em algumas realizações, uma composição fermentativa compreende a célula hospedeira e o isobutanol produzido de acordo com os métodos fornecidos acima.

[041] As composições que compreendem i) uma levedura recombinante com capacidade de produzir butanol, ii) butanol e iii) não mais do que cerca de DHMB de 0,5 mM também são fornecidas.

[042] Os métodos para produzir uma célula hospedeira recombinante também são fornecidos. Tais métodos podem compreender (a) fornecer uma célula hospedeira recombinante que compreende uma modificação em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de desidrogenase de aldeído ou atividade de aldeído oxidase; e (b)

transformar a célula hospedeira com um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de uma via biossintética de isobutanol.

[043] Os métodos para reduzir ou eliminar a conversão de isbutiraldeído para ácido isobutírico também são fornecidos. Tais métodos podem compreender (a) fornecer a célula hospedeira recombinante de qualquer uma das reivindicações 1 a 52; e (b) submeter a célula hospedeira às condições em que a conversão de isbutiraldeído para ácido isobutírico é reduzida ou eliminada em comparação aos métodos que usam uma célula hospedeira recombinante que não compreende atividade de desidrogenase de aldeído e/ou aldeído oxidase reduzida ou eliminada.

[044] Determinados polipeptídeos também são fornecidos no presente documento. Em algumas realizações, os polipeptídeos compreendem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade ou pelo menos cerca de 99% de identidade com SEQ ID NO: 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 417, 419, 421, 423, 425, 427, 429, 431, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 624, 626, 628, 630, 632 ou um fragmento ativo dos mesmos e têm atividade de cetol-ácido redutoisomerase. Em algumas realizações, os polipeptídeos compreendem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade ou pelo menos cerca de 99% de identidade com SEQ ID NO: 417, 419, 421, 423, 425 ou 427 ou um fragmento ativo dos mesmos e têm atividade de cetol-ácido redutoisomerase. Em algumas realizações, um

polipeptídeo compreende uma sequência com pelo menos cerca de 90% de identidade, pelo menos cerca de 95% de identidade ou pelo menos cerca de 99% de identidade com SEQ ID NO: 927, 928, 196, 266, 267, 389, 405, 637, 781, 782, 783, 835, 853, 854, 855, 856, 857 ou 859.

[045] Os polinucleotídeos que codificam tais polipeptídeos e células hospedeiras que compreendem tais polinucleotídeos e polipeptídeos também são fornecidos.

[046] Os métodos de conversão de acetolactato para 2,3-diidroxiiisovalerato também são fornecidos. Por exemplo, tais métodos podem compreender (a) fornecer um polipeptídeo descrito acima e (b) colocar em contato o polipeptídeo com acetolactato sob condições em que o 2,3-diidroxiiisovalerato é produzido.

[047] As células de levedura recombinantes também são fornecidas no presente documento. Em algumas realizações, uma levedura recombinante compreende uma via biossintética com capacidade de converter piruvato para acetolactato e a levedura produz menos do que 0,01 mols de 2,3-dihidroxi-2-metil butirato (DHMB) por mol de açúcar consumido. Em algumas realizações, uma levedura recombinante compreende capacidade de converter piruvato para acetolactato e a levedura produz DHMB em uma taxa de menos do que cerca de 1,0 mM/hora. Em algumas realizações, uma levedura recombinante compreende uma via biossintética com capacidade de converter piruvato para acetolactato e a levedura produz uma quantidade de 2,3-dihidroxi-3-isovalerato (DHIV) que é pelo menos cerca de 1,5 vezes a quantidade de DHMB produzido.

[048] Os métodos de identificação de um gene envolvido na produção de DHMB também são fornecidos. Em algumas realizações, os métodos compreendem (i) fornecer uma coleta de cepas de levedura que compreendem pelo menos dois ou mais deleções de gene; (ii) medir a

quantidade de DHMB produzido por cepas individuais de levedura; (iii) selecionar uma cepa de levedura que produz não mais do que cerca de 1,0 mM DHMB/hora; e (iv) identificar o gene que é apagado na cepa de levedura selecionada. Em algumas realizações, os métodos compreendem (i) fornecer uma coleta de cepas de levedura que aumentam a expressão de pelo menos dois ou mais genes; (ii) medir a quantidade de DHMB produzido por cepas individuais de levedura; (iii) selecionar uma cepa de levedura que produz pelo menos cerca de 1,0 mM DHMB; e (iv) identificar o gene que é superexpresso na cepa de levedura selecionada.

[049] Os métodos para a produção de butanol também são fornecidos. Em algumas realizações, os métodos compreendem (a) cultivar uma levedura recombinante que compreende uma via biossintética com capacidade de converter piruvato para acetolactato sob condições nas quais o butanol é produzido; e b) medir concentração de DHIV e/ou DHMB. Em algumas realizações, o cultivo e medição podem ser realizados simultaneamente ou de forma sequencial e em qualquer ordem. Em algumas realizações, a medição compreende espectrometria de massa de cromatografia líquida.

[050] Os métodos para aumentar a atividade de cetol-ácido redutoisomerase (KARI) também são fornecidos. Em algumas realizações, os métodos compreendem (a) fornecer uma composição que compreende acetolactato, uma enzima KARI e uma enzima de acetolactato redutase e (b) diminuir os níveis de DHMB. Em algumas realizações, a diminuição de níveis de DHMB é alcançada diminuindo-se a atividade de enzima de acetolactato redutase. Em algumas realizações, a diminuição dos níveis de DHMB é alcançada removendo-se DHMB da composição.

[051] Em algumas realizações, o aumento da produtividade da enzima KARI em uma célula hospedeira pode compreender cultivar uma célula

hospedeira, em que a célula hospedeira compreende uma enzima KARI heteróloga e pelo menos uma modificação genética que reduz, interrompe ou elimina a expressão ou atividade de acetolactato redutase e em que a enzima de atividade de KARI é diminuída na presença de DHMB. Em algumas realizações, o KARI tem pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com *E. coli* ou *L. lactis* KARI. Em algumas realizações, a expressão ou atividade de acetolactato redutase reduzida, interrompida ou eliminada reduz substancialmente a presença de DHMB.

[052] Os métodos para aumentar a atividade de diidroxiácido desidratase (DHAD) também são fornecidos. Em algumas realizações, os métodos compreendem (a) fornecer uma composição que compreende diidroxiisovalerato (DHIV) e uma enzima de DHAD e (b) diminuir os níveis de DHMB.

**BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E INCORPORAÇÃO A TÍTULO DE REFERÊNCIA DA**  
**TABELA PREENCHIDA ELETRONICAMENTE COM A MESMA**

[053] A invenção pode ser mais completamente compreendida a partir da descrição detalhada a seguir, as Figuras e as descrições de sequência anexa, das quais formam parte deste pedido.

[054] A Figura 1 mostra quatro diferentes vias biossintéticas de isobutanol. As etapas rotuladas "a", "b", "c", "d", "e", "f", "g", "h", "i", "j" e "k" representam as conversões de substrato para produto descritas abaixo.

[055] A Figura 2 retrata um alinhamento das sequências de amino ácido do KARI de *Pseudomonas fluorescens* ("PF5"; SEQ ID NO: 5) e KARI de *Anaerostipes caccae* ("K9"; SEQ ID NO: 27). As posições em destaque são direcionadas para mutagênese, conforme descrito no presente documento.

[056] As Figuras 3A, 3B e 3C retratam um alinhamento das sequências de amino ácido de enzimas de KARI de *Bifidobacterium angulatum* DSM 20098 ("K1"; SEQ ID NO: 141), *Bifidobacterium dentium* ATCC27678 ("K2"; SEQ ID NO: 143), *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 ("K7"; SEQ ID NO: 275), *Anaerostipes caccae* DSM 14662 ("K9"; SEQ ID NO: 27), *Enterococcus gallinarum* EG2 ("K25" SEQ ID NO: 376), *Streptococcus thermophilus* LMD-9 ("K26" SEQ ID NO: 121), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 ("K29"; SEQ ID NO: 382), *Zymomonas mobilis* ("S2"; SEQ ID NO: 277) e *Lactococcus lactis* ("LTS"; SEQ ID NO: 380). As posições em destaque são direcionadas para mutagênese, conforme descrito no presente documento.

[057] A Figura 4 é um mapa de plasmídeo de vetor pLH556 (pHR81-PIIv5-Pf5.KARI) (SEQ ID NO: 138).

[058] A Figura 5 mostra a taxa específica de produção de isobutanol, Q<sub>p</sub>, das duas cepas, PNY1910 e PNY2242.

[059] A Figura 6 mostra o acúmulo de DHIV + DHMB no sobrenadante de cultura durante o curso de tempo de fermentação com PNY1910 (triângulos) e PNY2242 (diamantes). (DHMB e DHIV não são distinguidos pelo método de HPLC usado).

[060] A Figura 7 mostra o rendimento de glicerol, ácido pirúvico, 2,3-butanediol (BDO), DHIV/DHMB, α-cetoisovalerato (αKIV) e ácido isobutírico (iBuAc). DHIV e DHMB são mostrados em conjunto à medida que esses não são distinguidos pelo método de HPLC usado.

[061] A Figura 8 mostra uma descrição resumida de valores  $V_{\max}/K_M$  para variantes K9G9, conforme descrito no Exemplo 16.

[062] As Figuras 9A, B e C mostram relações de rendimento molar de isobutanol para glicerol, rendimentos molares de isobutanol e titulações de isobutanol para variantes de K9, conforme descrito no exemplo 19.



[063] A Figura 10 mostra uma via biossintética de isobutanol. A etapa "a" representa a conversão de piruvato para acetolactato. A etapa "b" representa a conversão de acetolactato para DHIV. A etapa "c" representa a conversão de DHIV para KIV. A etapa "d" representa a conversão de KIV para isobutiraldeído. A etapa "e" representa a conversão de isobutiraldeído para isobutanol. A etapa "f" representa a conversão de acetolactato para DHMB.

[064] A Figura 11 mostra uma árvore filogenética de YMR226c homólogos de espécies de levedura de ascomiceto. Uma sequência de fungo filamentoso (*Neurospora crassa*) está incluída como um grupo externo.

[065] A Figura 12 mostra um alinhamento de sequência múltipla (MSF Format) de sequências de nucleotídeo de ORFs com homologia à YMR226C. Os nomes de gene mostrados correspondem aos números de acesso e SEQ ID NOs. Os dados na Tabela 7. O alinhamento foi produzido por AlignX (Vetor NTI).

[066] A Figura 13 mostra um gráfico do rendimento molar of DHMB ao longo do tempo.

[067] A Figura 14 retrata a produção de isobutanol e ácido isobutírico na cepa de levedura NYLA84.

[068] A Tabela Z- é uma tabela (depositada eletronicamente com a mesma e incorporada a título de referência) do perfil HMM de enzimas experimentalmente verificadas de KARI listadas na Tabela 1 e conforme descrito nos Publicações de Pedido de nº U.S. 2010/0197519 e 2009/0163376, que são incorporadas ao presente documento a título de referência em suas integridades.

**TABELA 1. ENZIMAS DE KARI EXPERIMENTALMENTE VERIFICADAS.**

Número de GI	Acesso	SEQ ID NO	Micro-organismo
70732562	YP_262325.1	5	<i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i>
15897495	NP_342100.1	1	<i>Sulfolobus solfataricus P2</i>
18313972	NP_560639.1	2	<i>Pyribaculum aerophilum str IM2</i>
76801743	YP_326751.1	7	<i>Natronomonas</i>

Número de GI	Acesso	SEQ ID NO	Micro-organismo
			<i>pharaonis</i> DSM 2160
16079881	NP_390707.1	8	<i>Bacillus subtilis</i> <i>subsp subtilis str 168</i>
19552493	NP_600495.1	9	<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i> ATCC 13032
6225553	O32414	10	<i>Phaeosporium</i> <i>molischianum</i>
17546794	NP_520196.1	3	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i> GMI1000
56552037	YP_162876.1	11	<i>Zymomonas mobilis</i> <i>subsp. Mobilis</i> ZM4
114319705	YP_741388.1	12	<i>Alkalilimnicola</i> <i>ehrlchei</i> MLHE-1
57240359	ZP_00368308.1	13	<i>Campylobacter lari</i> RM2100
120553816	YP_958167.1	14	<i>Marinobacter</i> <i>aquaeolei</i> VT8
71065099	YP_263826.1	15	<i>Psychrobacter</i> <i>arcticus</i> 273-4
83648555	YP_436990.1	16	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396
74318007	YP_315747.1	17	<i>Thiobacillus</i> <i>danitrificans</i> ATCC 25259
67159493	ZP_00420011.1	18	<i>Azotobacter</i> <i>vinelandii</i> AvOP
66044103	YP_233944.1	19	<i>Pseudomas syringae</i> <i>pv. syringae</i> B728a
28868203	NP_790822.1	20	<i>Pseudomas syringae</i> <i>pv. Tomato astr</i> DC3000
26991362	NP_746787.1	21	<i>Pseudomas putida</i> KT2440
104783656	YP_610154.1	22	<i>Pseudomas</i> <i>entomophila</i> L48
146306044	YP_001186509.1	23	<i>Pseudomonas</i> <i>mendocina ymp</i>
15599888	NP_253382.1	4	<i>Pseudomas</i> <i>aeruginosa</i> PAO1
42780593	NP_977840.1	24	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10987
42781005	NP_978252.1	25	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10987
266346	Q01292 6	6	<i>Spinacia oleracea</i>

[069] As onze posições no perfil HMM que representam as colunas no alinhamento que corresponde às onze posições de troca de cofator no KARI de *Pseudomonas fluoresceins* Pf-5 são identificadas as posições 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 e 170. A Tabela Z é submetida com a

mesma eletronicamente e é incorporada no presente documento a título de referência.

[070] As sequências fornecidas na listagem de sequência depositada com a mesma (Nome: 20120323\_CL5367USNA\_SEQLIST.txt; tamanho 2,003,893 bytes; Data de Criação 23 de março de 2012), está incorporada ao presente documento a título de referência.

[071] Consistentes com o Padrão ST.25 (2009) de Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO), determinados Iniciadores dados na listagem de sequência e no presente documento usam N para representar nucleotídeos a ou g ou c ou t. K é usado para representar g ou t. M é usado para representar um ou c.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[072] A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm os mesmos significados conforme comumente compreendida por alguém de habilidade comum na técnica ao qual esta invenção pertence. Em caso de conflito, o presente pedido inclui as definições tomarão controle. Além disso, a menos que exigido de outro modo por contexto, os termos singulares devem incluir pluralidades e termos plurais devem incluir o singular. Todas as publicações, patentes e outras referências mencionadas no presente documento são incorporadas a título de referência em suas integridades para todos os fins como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado a título de referência, a menos que somente seções específicas de patentes ou publicações de patente são indicadas para serem incorporadas a título de referência.

[073] Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles revelados no presente documento possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais adequados são revelados

abaixo. Os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos e não são destinados a serem limitativos. Outros atributos e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada e das reivindicações.

[074] A última etapa na biossíntese de isobutanol por meio de uma via biossintética que utiliza piruvato é a conversão de isobutiraldeído para isobutanol (Figura 1). Uma reação lateral nessa via é a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico que resulta em quantidades reduzidas de isobutiraldeído disponível para conversão em isobutanol e rendimento reduzido de isobutanol. Para um processo biossintético eficiente, há uma necessidade de evitar a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico de modo que as quantidades elevadas de isobutiraldeído estejam disponíveis para conversão para isobutanol e os rendimentos de isobutanol são aumentados.

[075] As aldeído desidrogenases são uma família de enzimas que catalisam a oxidação (deidrogenação) de aldeídos (Wang *et al.*, *J. Bacteriol.* 180:822-30, 1998; Navarro-Avino *et al.*, *Yeast* 15:829-42, 1999; e Saint- Prix *et al.*, *Microbiology* 150:2209-20, 2004). Há uma necessidade de identificar aldeído desidrogenases adequadas que possam ser modificadas para reduzir ou eliminar a atividade de desidrogenase de aldeído e possam reduzir ou eliminar a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico, de modo que as quantidades elevadas de isobutiraldeído estejam disponíveis para conversão para isobutanol e rendimentos de isobutanol sejam aumentados.

[076] As aldeído oxidases são uma família de enzimas que catalisam a produção de ácidos carboxílicos a partir de aldeídos (Nomura *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1134-7, 1998; e Johnson *et al.*, *Genetics* 151:1379-1391, 1999). Há uma necessidade de identificar aldeído oxidases adequadas que possam ser modificadas para reduzir ou eliminar a atividade de aldeído oxidase e possam reduzir ou eliminar a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico, de modo que quantidades elevadas de isobutiraldeído

estejam disponíveis para conversão para isobutanol e rendimentos de isobutanol sejam aumentados.

[077] A via de biossíntese para a produção de butanol na levedura geneticamente projetada inclui a conversão de acetolactato para 2,3-dihidroxi-3-isovalerato (DHIV), que é subsequentemente convertido para butanol. Consulte a Figura 10. No entanto, uma reação lateral nessa via, que diminui a produção geral de butanol, é a conversão de acetolactato para 2,3-dihidroxi-2-metilbutirato (DHMB). De fato, as requerentes constataram que DHMB tem efeitos inibitórios em enzimas (dihidroxiácido desidratase e cetol-ácido redutoisomerase) em uma via de produção de isobutanol. Para um processo biossintético eficiente, há uma necessidade de evitar a conversão de acetolactato para DHMB.

[078] As requerentes resolveram os problemas apontados fornecendo células hospedeiras recombinantes de levedura que compreendem uma via biossintética de isobutanol; e pelo menos um dentre: i) atividade de aldeído desidrogenase reduzida ou eliminada ii) atividade de aldeído oxidase reduzida ou eliminada iii) atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada; iv) um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de cetol-ácido redutoisomerase; e v) um polipeptídeo heterólogo que tem atividade de cetol-ácido redutoisomerase. Ainda, as requerentes fornecem métodos de produção de butanol que utiliza tais células hospedeiras. Tais células hospedeiras recombinantes podem ser usadas para aumentar a produção de um produto de uma via biossintética (por exemplo, isobutanol, 1-butanol ou 2-butanol) e/ou reduzir ou eliminar a conversão de via intermedia para subprodutos indesejáveis. As requerentes também forneceram uma estratégia de triagem adequada para avaliar várias enzimas candidatas. As enzimas identificadas podem ser alteradas para intensificar a produção de um produto de uma via biossintética (por exemplo, isobutanol, 1-butanol ou 2-

butanol) e/ou reduzir ou eliminar a conversão de via intermedia a subprodutos indesejáveis.

[079] De modo a definir adicionalmente esta invenção, os termos, abreviações e definições são fornecidas.

[080] Será compreendido que "derivado de" em referência aos polipeptídeos revelados no presente documento abrangem sequências sintetizadas com base nas sequências de amino ácido das KARIs presentes nos organismos indicados assim como aqueles clonados diretamente do material genético do organismo.

[081] Conforme usado no presente documento, os termos "compreende", "compreender", "inclui", "incluir", "tem", "ter", "contém" ou "conter", ou qualquer outra variação dos mesmos será compreendida para implicar a inclusão de um número inteiro indicado ou grupo de números inteiros mas não a exclusão de nenhum outro número inteiro ou grupo de números inteiros e são destinados a serem não-exclusivos ou de terminação aberta. Por exemplo, uma composição, uma mistura, um processo, um método, um artigo ou um aparelho que compreende uma lista de elementos não é necessariamente limitada somente aqueles elementos, mas podem incluir outros elementos não expressamente listados ou inerentes a tal composição, mistura, processo, método, artigo ou aparelho. Ainda, a menos que expressamente indicado o contrário, "ou" se refere a uma ou inclusivo e não a um ou exclusivo. Por exemplo, uma condição A ou B é satisfeita por qualquer um dentre os seguintes: A é verdadeiro (ou presente) e B é também (ou não presente), A é também (ou não presente) e B é verdadeiro (ou presente) e ambos A e B são verdade (ou presentes).

[082] Conforme usado no presente documento, o termo "consiste em", ou variações tais como "consistem em ou "consistir em", conforme usado em todo o relatório descritivo e reivindicações, indicam a inclusão de qualquer

número inteiro citado ou grupo de números inteiros citados, mas que nenhum número inteiro ou grupo de números inteiros adicionais pode ser adicionado ao método, estrutura ou composição especificada.

[083] Conforme usado no presente documento, o termo "consiste essencialmente em", ou variações tais como "consistem essencialmente em" ou "consistir essencialmente em", conforme usado por todo o relatório descritivo e reivindicações, indicam a inclusão de qualquer número inteiro ou grupo de números inteiros citados e a inclusão opcional de qualquer número inteiro ou grupo de números inteiros citados que não mudam materialmente as propriedades básicas ou novas do método, estrutura ou composição especificada. consultar M.P.E.P. § 2111.03.

[084] Além disso, os artigos indefinidos "um" e "uma" que precedem um elemento ou componente da invenção são destinados a serem não restritivos em relação ao número de instâncias, isto é, ocorrências do elemento ou componente. Portanto, "um" ou "uma" deve ser lido de modo a incluir um ou pelo menos uma e a forma de palavra em singular do elemento ou componente também inclui o plural a menos que o número seja obviamente destinado a ser singular.

[085] O termo "invenção" ou "presente invenção", conforme usado no presente documento, é um termo não limitativo e não é destinado a se referir a nenhuma realização única da invenção particular, mas abrangem todas as possíveis realizações, conforme descrito nas reivindicações conforme apresentado ou conforme emendado e suplementado posteriormente ou no relatório descritivo.

[086] Conforme usado no presente documento, o termo "cerca de" que modifica a quantidade de um ingrediente ou reagente da invenção empregada se refere à variação na quantia numérica que pode ocorrer, por exemplo, através de medição típica e procedimentos de manuseamento de

líquido usados para criar concentrados ou soluções no mundo real; através de erro inadvertente nesses procedimentos; através de diferenças na fabricação, fonte ou pureza dos ingredientes empregados para criar as composições ou para executar os métodos; e similares. O termo "cerca de" também abrange quantidades que diferem devido às diferentes condições de equilíbrio para uma composição que resulta de uma mistura inicial particular. Se modificadas pelo termo "cerca de" ou não, as reivindicações incluem equivalentes às quantias. Em uma realização, o termo "cerca de" significa estar dentro de 10% do valor numérico reportado ou dentro de 5% do valor numérico reportado.

[087] Conforme usado no presente documento, "sinérgico" se refere a um efeito maior do que aditivo produzido por uma combinação (isto é, um efeito que é maior do que a soma de efeitos individuais) ou um efeito aditivo quando os efeitos individuais não são esperados para serem aditivos. O termo também se refere à adição de um composto que resulta em menos de outro composto que é exigido.

[088] O termo "via biossintética de butanol", conforme usado no presente documento, se refere à via enzimática para produzir 1 -butanol, 2-butanol ou isobutanol. Por exemplo, as vias biossintéticas de isobutanol são reveladas no Publicação de Pedido de Patente de nº U.S. 2007/0092957, que é incorporado a título de referência ao presente documento.

[089] O termo "via biossintética de isobutanol" se refere à via enzimática para produzir isobutanol. Determinadas vias biossintéticas de isobutanol são ilustradas na Figura 1 e descritas no presente documento. Periodicamente "via biossintética de isobutanol" é usado de forma sinônima com "via de produção de isobutanol".

[090] O termo "butanol", conforme usado no presente documento, se refere a 2-butanol, 1 -butanol, isobutanol ou misturas dos mesmos. O isobutanol também é conhecido como 2-metil-1- propanol.



[091] Uma célula hospedeira recombinante que compreende um "via projetada de produção de álcool" (tal como uma via projetada de produção de butanol ou isobutanol) se refere a uma célula hospedeira que contém uma via modificada que produz álcool de maneira diferente daquela normalmente presente na célula hospedeira. Tais diferenças incluem produção de um álcool não tipicamente produzido pela célula hospedeira ou aumentada ou produção mais eficiente.

[092] O termo "via biossintética heteróloga", conforme usado no presente documento, se refere a uma enzima via para produzir um produto no qual pelo menos uma das enzimas não é endógena à célula hospedeira que contém a via biossintética.

[093] O termo "agente de extração", conforme usado no presente documento, se refere a um ou mais solventes orgânicos que podem ser usados para extrair butanol de um caldo de fermentação.

[094] O termo "produtividade eficaz de isobutanol", conforme usado no presente documento, se refere à quantidade total em gramas de isobutanol produzido por grama de células.

[095] O termo "titulação eficaz" conforme usado no presente documento, se refere à quantidade total de um álcool particular (por exemplo, butanol) produzido por fermentação por litro de meio de fermentação. A quantidade total de butanol inclui: (i) a quantidade de butanol no meio de fermentação; (ii) a quantidade de butanol recuperado do agente orgânico de extração; e (iii) a quantidade de butanol recuperado a partir da fase de gás, se esgotamento de gás for usado.

[096] O termo "taxa eficaz" conforme usado no presente documento, se refere à quantidade total de butanol produzido por fermentação por litro de meio de fermentação por hora de fermentação.

[097] O termo "rendimento eficaz" conforme usado no presente documento, se refere à quantidade de butanol produzido por unidade de substrato de carbono fermentável consumido pelo biocatalisador.

[098] O termo "separação", conforme usado no presente documento, é sinônimo de "recuperação" e se refere à remoção um composto químico de uma mistura inicial para obter o composto em maior pureza ou em uma concentração maior do que a pureza ou concentração do composto na mistura inicial.

[099] O termo "fase aquosa", conforme usado no presente documento, se refere à fase aquosa de uma mistura bifásica obtida colocando-se em contato um caldo de fermentação com um agente orgânico de extração imiscível em água. Em uma realização de um processo descrito no presente documento que inclui extração fermentativa, o termo "caldo de fermentação" então se refere especificamente à fase aquosa em extração fermentativa bifásica.

[0100] O termo "fase orgânica", conforme usado no presente documento, se refere à fase não aquosa de uma mistura bifásica obtida colocando-se em contato um caldo de fermentação com um agente orgânico de extração imiscível em água.

[0101] Os termos "PDC-", "nocaute de PDC", ou "PDC-KO", conforme usado no presente documento, se referem a uma célula que tem uma modificação genética para inativar ou reduzir a expressão de um gene que codifica piruvato decarboxilase (PDC) de modo que a célula substancial ou completamente carece de atividade de enzima de piruvato decarboxilase. Se a célula tem mais de um gene de PDC expresso(ativo), então cada um dos genes de PDC ativos pode ser inativado ou ter produção mínima produzindo desse modo uma célula de PDC.

[0102] O termo "polinucleotídeo" é destinado a abranger um singular ácido nucleico assim como ácidos nucleicos plurais e se refere a uma molécula de ácido nucleico ou construção, por exemplo, RNA (mRNA) mensageiro ou DNA (pDNA) de plasmídeo. Um polinucleotídeo pode conter a sequência de nucleotídeo da sequência de cDNA de comprimento total ou um fragmento da mesma, incluindo as sequências 5' e 3' não transladas e as sequências de codificação. O polinucleotídeo pode ser composto de qualquer poliribonucleotídeo ou polideoxiribonucleotídeo, que podem ser não RNA ou DNA modificados ou RNA ou DNA modificados. Por exemplo, os polinucleotídeos podem ser compostos de DNA único ou de duplo filamento, DNA que é uma mistura de regiões únicas e de duplo filamento, RNA único e de duplo filamento e RNA que é mistura de regiões únicas e de duplo filamento, moléculas híbridas que compreendem DNA e RNA que podem ser de filamento único ou, mais tipicamente, de filamento duplo ou uma mistura de regiões únicas e de duplo filamento. "polinucleotídeo" abrange formas química, enzimática ou metabolicamente modificadas.

[0103] Uma sequência de polinucleotídeo pode ser referida como "isolada", na qual a mesma foi removida de seu ambiente nativo. Por exemplo, um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo ou fragmento de polipeptídeo que tem atividade de diidroxí-ácido desidratase contida em um vetor é considerada isolada para os fins da presente invenção. Exemplos adicionais de um polinucleotídeo isolado incluem polinucleotídeos recombinantes mantidos em células hospedeiras heterólogas ou polinucleotídeos (parcial ou substancialmente) purificados em solução. Os polinucleotídeos isolados ou ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção incluem adicionalmente tais moléculas produzidas sinteticamente. Um fragmento de polinucleotídeo isolado na forma de um polímero de DNA pode

ser compreendido de um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico ou DNA sintético.

[0104] O termo "ensaio de consumo de NAD(P)H" se refere a um ensaio de enzima para a determinação da atividade específica da enzima KARI, que envolve medir o desaparecimento do cofator de KARI, NAD(P)H, da reação de enzima. Tais ensaios são descritos em Aulabaugh e Schloss, *Biochemistry* 29: 2824-2830, 1990, que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua integridade.

[0105] O termo "NAD(P)H" se refere tanto a NADH como a NADPH.

[0106] "KARI" é a abreviação para a enzima cetol-ácido redutoisomerase.

[0107] O termo "em grande proximidade" ao se referir à posição de vários resíduos de aminoácidos de uma enzima KARI em relação ao adenosil 2'-fosfato de NADPH representa os aminoácidos no modelo tridimensional para a estrutura da enzima que estão dentro de cerca de 4,5 Å do átomo fosforoso do adenosil 2'-fosfato de NADPH ligado à enzima.

[0108] O termo "cetol-ácido redutoisomerase" (abreviado "KARI") e "ácido hidroxiacético isomeroreductase" será usado de forma intercambiável e se referir às enzimas com capacidade de catalisar a reação de (S)-acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato, classificado como número EC de EC 1.1.1.86 (*Enzima Nomenclature* 1992, Academic Press, San Diego). Conforme usado no presente documento, o termo "Classe I enzima de cetol-ácido redutoisomerase" significa a forma curta que tem tipicamente entre 330 e 340 resíduos de aminoácidos e é distinta da forma longa, denominada classe II, que tem tipicamente aproximadamente 490 resíduos. Essas enzimas estão disponíveis a partir de um número de fontes, que incluem, porém, sem limitação, *E. coli* <1> (aminoácido de SEQ ID NO: 942; Acesso GenBank de Número

NC\_000913 REGION: 3955993.3957468), *Vibrio cholerae* (Acessão GenBank de Número NC\_002505 REGION: 157441.158925), *Pseudomonas aeruginosa*, (Acessão GenBank de Número NC\_002516, REGION: 5272455.5273471 ) e *Pseudomonas fluorescens* (aminoácido de SEQ ID NO: 943; Acesso GenBank de Número NC\_004129 REGION: 6017379.6018395). As enzimas de KARI são descritas, por exemplo, nos documentos de patente nº U.S. 7.910.342 e 8.129.162 e Pedido de publicação de patente de nº U.S.2010/0197519, dos quais todos estão incorporados ao presente documento a título de referência em suas integridades.

[0109] A KARI é constatada em uma variedade de organismos e comparação de sequência de aminoácido através de espécies revelaram que há 2 tipos dessa enzima: uma forma curta (classe I) constatada em fungos e na maioria das bactérias e uma forma longa (classe II) típica de plantas. As KARIs de Classe I tipicamente têm entre 330 a 340 resíduos de aminoácidos. As enzimas de KARI de forma longa têm cerca de 490 resíduos de aminoácidos. No entanto, algumas bactérias tais como *Escherichia coli* têm uma forma longa, em que a sequência de aminoácido difere de forma apreciável daquela constatada nas plantas. A KARI é codificada pelo gene *ilvC* e é uma enzima essencial para cultivo de *E. coli* e outras bactérias em um meio mínimo. As KARIs de Classe II consistem geralmente em um domínio N-terminal de 225 resíduos e um domínio C-terminal de 287 resíduos. O domínio N-terminal, que contém o Sítio de ligação NADPH, tem uma estrutura  $\alpha\beta$  e remete a domínios constatados em outras oxidoredutases dependentes de nucleotídeo de piridina. O domínio C terminal consiste quase inteiramente de  $\alpha$ - hélices.

[0110] As enzimas de cetol-ácido redutoisomerase (KARI) são úteis em vias para a produção de isobutanol com o uso de micro-organismos projetados (documentos de patente nº U.S. 7,851,188 e nº U.S. 7,993,889, incorporados a título de referência no presente documento).

[0111] Uma KARI que pode utilizar NADH pode capitalizar no NADH produzido pelo glicolítico existente e outras vias metabólicas nas células microbianas mais comumente usadas e pode resultar em produção aprimorada de isobutanol. Rane *et al.* (*Arch. Biochem. Biophys.*, 338: 83-89, 1997) discute a troca de cofator de uma cetol-ácido redutoisomerase isolada de *E. coli*. As publicações de pedido nºs U.S. 2009/0163376 e 2010/0197519 (cada uma das quais está incorporada ao presente documento a título de referência em sua integridade) descrevem a geração de enzimas de KARI que podem usar NADH. A Publicação de pedido nº U.S. 2010/0143997 (que está incorporada ao presente documento a título de referência em sua integridade) descreve variantes de *E. coli* com valores aprimorados de  $K_M$  para NADH.

[0112] Os termos "atividade de cetol-ácido redutoisomerase" e "atividade de KARI" se referem à capacidade de catalisar a conversão (S) de substrato para produto - acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato.

[0113] O termo "acetolactato sintase" se refere a uma enzima que catalisa a conversão de piruvato para acetolactato e  $\text{CO}_2$ . O acetolactato tem dois estereoisômeros ((R) e (S)); a enzima prefere o isômero (S), que é feito por sistemas biológicos. determinadas acetolactato sintases são conhecidas pelo número EC 2.2.1.6 (*Enzima Nomenclature 1992*, Academic Press, San Diego). Essas enzimas estão disponíveis a partir de um número de fontes, incluindo, porém, sem limitação, sequência de aminoácido de *Bacillus subtilis* (GenBank Nºs: CAB15618, Z99122, NCBI (Centro Nacional de Informações de Biotecnologia), sequência de nucleotídeo NCBI, respectivamente), *Klebsiella pneumoniae* (GenBank Nºs: AAA25079, M73842 e *Lactococcus lactis* (GenBank Nºs: AAA25161, L16975).

[0114] O termo "ácido hidroxiaacético desidratase" se refere a uma enzima que catalisa a conversão de 2,3-diidroxiisovalerato para  $\alpha$ -cetoisovalerato. Determinadas ácido hidroxiaacético desidratases são conhecidas pelo

número EC 4.2.1.9. Essas enzimas estão disponíveis a partir de uma vasta ordem de micro-organismos, incluindo, porém, sem limitação, *E. coli* (GenBank N<sup>os</sup>: YP\_026248, NC\_000913), *S. cerevisiae* (GenBank N<sup>os</sup>: NP\_012550, NC\_001142), *M. maripaludis* (GenBank N<sup>os</sup>: CAF29874, BX957219), *B. subtilis* (GenBank N<sup>os</sup>: CAB14105, Z99115), *Lactococcus lactis* (SEQ ID NO: 926) e *Streptococcus mutans* (SEQ ID NO: 939).

[0115] O termo "α-cetoácido decarboxilase de cadeia ramificada" se refere a uma enzima que catalisa a conversão de α-cetoisovalerato para isobutiraldeído e CO<sub>2</sub>. Determinadas α-cetoácido decarboxilases de cadeia ramificada são conhecidas pelo número EC 4.1.1.72 e estão disponíveis a partir de um número de fontes, incluindo, porém, sem limitação, *Lactococcus lactis* (GenBank N<sup>os</sup>: AAS49166, AY548760; CAG34226, AJ746364), *Salmonella typhimurium* (GenBank N<sup>os</sup>: NP-461346, NC-003197), *Clostridium acetobutylicum* (GenBank N<sup>os</sup>: NP-149189, NC-001988), *Macrococcus caseolyticus* (SEQ ID NO: 940) e *Listeria grayi* (SEQ ID NO: 941).

[0116] O termo "álcool desidrogenase de cadeia ramificada" se refere a uma enzima que catalisa a conversão de isobutiraldeído para isobutanol. Determinadas álcool desidrogenases de cadeia ramificada são conhecidas pelo número EC 1.1.1.265, mas também podem ser classificadas sob outras álcool desidrogenases (especificamente, EC 1.1.1.1 ou 1.1.1.2). Essas enzimas utilizam NADH (dinucleotídeo reduzido de adenina de nicotinamida) e/ou NADPH como doador de elétrons e estão disponíveis a partir de um número de fontes, incluindo, porém, sem limitação, *S. cerevisiae* (GenBank N<sup>os</sup>: NP\_010656, NC\_001136; NP\_014051, NC\_001145), *E. coli* (GenBank No: NP\_417484), *C. acetobutylicum* (GenBank N<sup>os</sup>: NP\_349892, NC\_003030), *B. indica* (aminoácido de SEQ ID NO: 945), *A. xylosoxidans* (aminoácido de SEQ ID NO: 944).

[0117] O termo "cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada" se refere a uma enzima que catalisa a conversão de  $\alpha$ -cetoisovalerato para isobutiril-CoA (isobutiril-cofator A), que usa NAD<sup>+</sup> (dinucleotídeo de adenina de nicotinamida) como receptor de elétrons. Determinadas cetoácido desidrogenases de cadeia ramificada são conhecidas pelo número EC 1.2.4.4. Essas cetoácido desidrogenases de cadeia ramificada compreendem quatro subunidades e sequências de todas as subunidades estão disponíveis a partir de uma vasta ordem micro-organismos, incluindo, porém, sem limitação, *B. subtilis* (GenBank N<sup>os</sup>: CAB 14336, Z99116; CAB14335, Z99116; CAB14334, Z99116; e CAB14337, Z99116) e *Pseudomonas putida* (GenBank N<sup>os</sup>: AAA65614, M57613; AAA65615, M57613; AAA65617, M57613; e AAA65618, M57613).

[0118] Conforme usado no presente documento, "atividade de desidrogenase de aldeído" se refere a qualquer polipeptídeo que tenha uma função biológica de uma desidrogenase de aldeído, incluindo os exemplos fornecidos no presente documento. Tais polipeptídeos incluem um polipeptídeo que catalisa a oxidação (deidrogenação) de aldeídos. Tais polipeptídeos incluem um polipeptídeo que catalisa a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico. Tais polipeptídeos também incluem um polipeptídeo que corresponde ao Número de Comissão de Enzimas EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 ou EC 1.2.1.5. Tais polipeptídeos podem ser determinados por métodos conhecidos na técnica e revelados no presente documento.

[0119] Conforme usado no presente documento, "atividade de aldeído oxidase" se refere a qualquer polipeptídeo que tenha uma função biológica de um aldeído oxidase, incluindo os exemplos fornecidos no presente documento. Tais polipeptídeos incluem um polipeptídeo que catalisa ácidos carboxílicos de aldeídos. Tais polipeptídeos incluem um polipeptídeo que catalisa a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico. Tais



polipeptídeos também incluem um polipeptídeo que corresponde ao Número de Comissão de Enzima EC 1.2.3.1. Tais polipeptídeos podem ser determinados por métodos conhecidos na técnica e revelados no presente documento.

[0120] Conforme usado no presente documento, "atividade de piruvato decarboxilase" se refere à atividade de qualquer polipeptídeo que tem uma função biológica de uma enzima de piruvato decarboxilase, incluindo os exemplos fornecidos no presente documento. Tais polipeptídeos incluem um polipeptídeo que catalisa a conversão de piruvato para acetaldeído. Tais polipeptídeos também incluem um polipeptídeo que corresponde ao Número de Comissão de Enzima 4.1.1.1. Tais polipeptídeos podem ser determinados por métodos conhecidos na técnica e revelados no presente documento. Um polipeptídeo que tem atividade de decarboxilato de piruvato pode ser, por meio de exemplo, PDC1, PDC5, PDC6 ou qualquer combinação dos mesmos.

[0121] Conforme usado no presente documento, "atividade de acetolactato redutase" se refere à atividade de qualquer polipeptídeo que tem a capacidade de catalisar a conversão de acetolactato para DHMB. Tais polipeptídeos podem ser determinados por métodos conhecidos na técnica e revelados no presente documento.

[0122] Conforme usado no presente documento, "DHMB" se refere a 2,3-dihidroxi-2-metil butirato. DHMB inclui "DHMB rápido", que tem a configuração 2S, 3S e "DHMB lento", que tem a configuração. Consulte Kaneko *et al.*, *Phytochemistry* 39: 115-120 (1995), que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua integridade e se refere ao DHMB rápido como ácido anglicérico e DHMB lento como ácido tiglicérico.

[0123] Conforme usado no presente documento, "atividade reduzida" se refere a qualquer diminuição mensurável em uma atividade biológica conhecida de um polipeptídeo quando comparada à mesma atividade biológica do polipeptídeo antes da mudança que resulta na atividade reduzida.

Tal uma mudança pode incluir uma modificação de um polipeptídeo ou um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo conforme descrito no presente documento. Uma atividade reduzida de um polipeptídeo revelado no presente documento pode ser determinada por métodos conhecidos na técnica e revelados no presente documento.

[0124] Conforme usado no presente documento, "atividade eliminada" se refere à abolição completa de uma atividade biológica conhecida de um polipeptídeo quando comparado à mesma atividade biológica do polipeptídeo antes da mudança que resulta na atividade eliminada. Tal uma mudança pode incluir uma modificação de um polipeptídeo ou um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo conforme descrito no presente documento. Uma atividade eliminada inclui uma atividade biológica de um polipeptídeo que não é mensurável quando comparado à mesma atividade biológica do polipeptídeo antes da mudança que resulta na atividade eliminada. Uma atividade eliminada de um polipeptídeo revelado no presente documento pode ser determinada por métodos conhecidos na técnica e revelados no presente documento.

[0125] O termo "substrato de carbono" ou "substrato de carbono fermentável" se refere a uma fonte de carbono com capacidade de ser metabolizada por organismos hospedeiros da presente invenção e, particularmente, fontes de carbono selecionadas dentre o grupo que consiste em monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e substratos de um carbono ou misturas dos mesmos. Os exemplos não limitativos de substratos de carbono são fornecidos no presente documento e incluem, porém, sem limitação, monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos, etanol, lactato, succinato, glicerol, dióxido de carbono, metanol, glucose, frutose, sacarose, xilose, arabinose, dextrose ou misturas dos mesmos. Outros substratos de carbono podem incluir etanol, lactato, succinato ou glicerol.

[0126] "Caldo de fermentação", conforme usado no presente documento, significa a mistura de água, açúcares (fontes de carbono fermentável), sólidos dissolvidos (se presentes), micro-organismos que produzem álcool, álcool de produto e todos os outros constituintes de material mantido no vaso de fermentação no qual o álcool de produto é feito pela reação de açúcares para álcool, água e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) pelos micro-organismos presentes. Periodicamente, conforme usado no presente documento, o termo "meio de fermentação" e "mistura fermentada" pode ser usado de forma sinônima com "caldo de fermentação".

[0127] "Biomassa", conforme usado no presente documento, se refere a um produto natural que contém um amido hidrolisável que fornece um açúcar fermentável, que inclui qualquer material e materiais celulósicos ou lignocelulósicos que compreendem celulose e compreendem opcional e adicionalmente hemicelulose, lignina, amido, oligossacarídeos, dissacarídeos, e/ou monossacarídeos. A biomassa também pode compreender componentes adicionais, tais como proteína e/ou lipídios. A biomassa pode ser derivada de uma única fonte ou a biomassa pode compreender uma mistura derivada de mais de uma fonte. Por exemplo, a biomassa pode compreender uma mistura de espigas de milho e palhas de milho ou uma mistura de grama e folhas. A biomassa inclui, porém, sem limitação, cultivos de bioenergia, resíduos agrícolas, restos sólidos municipais, restos sólidos industriais, lama de fabricação de papel, restos culturais, madeira e restos florestais. Os exemplos de biomassa incluem, porém, sem limitação, grão de milho, espigas de milho, resíduos de cultivo tais como casca de milho, palhas de milho, gramas, trigo, centeio, palha de trigo, cevada, palha de cevada, feno, palha de arroz, grama do tipo switchgrass, papel residual, bagaço de cana de açúcar, sorgo, soja, componentes obtidos a partir de trituração de grãos, árvores, ramos, raízes,

folhas, lascas de madeira, serragem, arbustos e moitas, vegetais, frutas, flores, adubo animal e misturas dos mesmos.

[0128] "Matéria-prima", conforme usado no presente documento, significa um produto que contém uma fonte de carbono fermentável. A matéria-prima adequada inclui, porém, sem limitação, centeio, trigo, com, cana de açúcar e misturas dos mesmos.

[0129] O termo "condições aeróbicas", conforme usado no presente documento, significa condições de cultivo na presença de oxigênio.

[0130] O termo "condições microaeróbicas", conforme usado no presente documento, significa condições de cultivo com baixos níveis de oxigênio (isto é, abaixo dos níveis normais de oxigênio atmosférico).

[0131] O termo "condições anaeróbicas", conforme usado no presente documento, significa condições de cultivo na ausência de oxigênio.

[0132] O termo "atividade específica", conforme usado no presente documento, é definido como unidades de atividade em uma dada quantidade de proteína. Desse modo, a atividade específica não é diretamente medida mas é calculada dividindo-se 1) a atividade em unidades/ml da amostra de enzima pela 2) concentração de proteína na amostra, de modo que a atividade específica seja expressa como unidades/mg, em que uma unidade de enzima é definida como mols de produto formado/minuto. A atividade específica de uma amostra de enzima pura completamente ativa é uma característica dessa enzima. A atividade específica de uma amostra de uma mistura de proteínas é uma medida da fração relativa de proteína na amostra que é composta da enzima ativa de interesse.

[0133] Os termos " $k_{cat}$ " e " $K_M$ " são conhecidos por aqueles versados na técnica e são descritos em *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> ed. (Ferst; W.H. Freeman Press, NY, 1985; pp 98 a 120).  $K_M$ , a constante de Michaelis, é a concentração de substrato que resulta na velocidade meio-

máxima. O termo " $k_{\text{cat}}$ " frequentemente denominado "número de renovação", é definido como o número máximo de moléculas de substrato convertidas para produtos por sítio ativo por tempo de unidade ou o número de vezes que a enzima se renova por tempo de unidade.  $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [E]$ , em que  $[E]$  é a concentração de enzima (Ferst, *supra*). Os termos "renovação total" e "número total de renovação" são usados no presente documento para se referir à quantidade de produto formado pela reação de uma enzima KARI com substrato.

[0134] O termo "eficiência catalítica" é definido como o  $k_{\text{cat}}/K_M$  de uma enzima. A eficiência catalítica é usada para quantificar a especificação de uma enzima para um substrato.

[0135] O termo "molécula de ácido nucleico isolado", "fragmento de ácido nucleico isolado" e "construção genética" será usado de forma intercambiável e significará um polímero de RNA ou DNA que é único ou de filamento duplo, contendo opcionalmente bases de nucleotídeo sintético, não naturais ou alternadas. Um fragmento de ácido nucleico isolado na forma de um polímero de DNA pode ser compreendido de um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico ou DNA sintético.

[0136] O termo "aminoácido" se refere à unidade estrutural química básica de uma proteína ou polipeptídeo. As seguintes abreviações são usadas no presente documento para identificar aminoácidos específicos:

<u>Aminoácido</u>	<u>Abreviação de três letras</u>	<u>Abreviação de uma letra</u>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F

<u>Aminoácido</u>	<u>Abreviação de três letras</u>	<u>Abreviação de uma letra</u>
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

[0137] O termo "gene" se refere a um fragmento de ácido nucleico que tem capacidade de ser expressa como uma proteína específica, que inclui opcionalmente sequências reguladoras que precedem (sequências 5' de não codificação) e seguem (sequências 3' de não codificação) a sequência de codificação. "Gene nativo" se refere a um gene conforme constatado na natureza com suas próprias sequências reguladoras. "Gene quimérico" se refere a qualquer gene que não é um gene nativo, que compreende sequências reguladoras e de codificação que não sejam constatadas em conjunto na natureza. Consequentemente, um gene quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de fontes diferentes ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de maneira diferente do que aquela constatada na natureza. "Gene endógeno" se refere a um gene nativo em sua localização natural no genoma de um micro-organismo. Um gene "estrangeiro" se refere a um gene não normalmente constatado no micro-organismo hospedeiro, mas que é introduzido no micro-organismo hospedeiro por transferência de gene. Os genes estrangeiros podem compreender genes nativos inseridos em um micro-organismo não nativo ou genes quiméricos. Um "transgene" é um gene que foi introduzido no genoma por um procedimento de transformação.

[0138] Conforme usado no presente documento, "nativo" se refere à forma de um polinucleotídeo, gene ou polipeptídeo conforme constatado na natureza com suas próprias sequências reguladoras, se presentes.

[0139] Conforme usado no presente documento o termo "sequência de codificação" ou "região de codificação" se refere a uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminoácido específica. "Sequências reguladoras adequadas" se referem às sequências de nucleotídeo localizadas a montante (sequências 5' de não codificação), dentro ou a jusante (sequências 3' de não codificação) de uma sequência de codificação e que influencia a transcrição, processamento de RNA ou estabilidade ou translação da sequência de codificação associada. As sequências reguladoras podem incluir promotores, sequências indutoras de translação, íntrons, sequências de reconhecimento de poliadenilação, sítios de processamento de RNA, sítios efetores de ligação e estruturas de haste-alça.

[0140] Conforme usado no presente documento, "endógeno" se refere à forma nativa de um polinucleotídeo, gene ou polipeptídeo em sua localização natural no organismo ou no genoma de um organismo. "Polinucleotídeo endógeno" inclui um polinucleotídeo nativo em sua localização natural no genoma de um organismo. "Gene endógeno" inclui um gene nativo em sua localização natural no genoma de um organismo. "Polipeptídeo endógeno" inclui um polipeptídeo nativo em sua localização natural no organismo transcrito e traduzido de um polinucleotídeo nativo ou gene em sua localização natural no genoma de um organismo.

[0141] O termo "heterólogo" quando usado em referência a um polinucleotídeo, um gene ou um polipeptídeo, se refere a um polinucleotídeo, gene ou polipeptídeo não normalmente constatado no organismo hospedeiro. "Heterólogo" também inclui uma região nativa de codificação ou porção da mesma, que é reintroduzida no organismo de fonte em uma forma que é diferente do gene nativo correspondente, por exemplo, não em sua localização natural no genoma do organismo. O polinucleotídeo heterólogo ou gene pode ser introduzido no organismo hospedeiro, por exemplo, por meio de

transferência de gene. Um gene heterólogo pode incluir uma região nativa de codificação com regiões reguladoras não nativas que são reintroduzidas ao hospedeiro nativo. Por exemplo, um gene heterólogo pode incluir uma região nativa de codificação que é uma porção de um gene quimérico que inclui regiões reguladoras não nativas que são reintroduzidas no hospedeiro nativo. "Polipeptídeo heterólogo" inclui um polipeptídeo nativo que é reintroduzido no organismo de fonte em uma forma que é diferente do polipeptídeo nativo correspondente.

[0142] Um "transgene" é um gene que foi introduzido no genoma por um procedimento de transformação.

[0143] Conforme usado no presente documento, o termo "modificado" se refere a uma mudança em um polinucleotídeo revelado no presente documento que resulta em atividade reduzida ou eliminada de um polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo, assim como uma mudança em um polipeptídeo revelado no presente documento que resulta na atividade reduzida ou eliminada do polipeptídeo. Tais mudanças podem ser feitas por métodos conhecidos na técnica, incluindo, porém, sem limitação, deletar, mutar (por exemplo, mutagênese espontânea, mutagênese aleatória, mutagênese causada por genes mutadores ou mutagênese de transposon), substituir, inserir, regular para baixo, alterar a localização celular, alterar o estado do polinucleotídeo ou polipeptídeo (por exemplo, metilação, fosforilação ou ubiquitinação), remover um cofator, introdução de um RNA/DNA antissenso, introdução de um RNA/DNA de interferência, modificado químico, modificado covalente, irradiação com UV ou raios-X, recombinação homóloga, recombinação mitótica, método de troca de promotor, e/ou combinações dos mesmos. A orientação ao determinar quais nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos podem ser modificados pode ser constatada comparando a sequência do polinucleotídeo ou polipeptídeo particular com aquela dos



polinucleotídeos homólogos ou polipeptídeos, por exemplo, de levedura ou bacteriana e maximizar o número de modificados feito em regiões de alta homologia (regiões conservadas) ou sequências de consenso.

[0144] O termo "elemento de expressão genética recombinante" se refere a um fragmento de ácido nucleico que expressa um ou mais proteína específicas, incluindo sequências reguladoras que precedem (sequências 5' de não codificação) e seguem (sequências de terminação 3') sequências de codificação para as proteínas. Um gene quimérico é um elemento de expressão genética recombinante. As regiões de codificação de um operon podem formar um elemento de expressão genética recombinante, junto a um promotor ligado de forma operável e região de terminação.

[0145] "Sequências reguladoras" se refere às sequências de nucleotídeo localizados a montante (sequências 5' de não codificação), dentro ou a jusante (sequências 3' de não codificação) de uma sequência de codificação e que influencia a transcrição, processamento de RNA ou estabilidade ou translação da sequência de codificação associada. As sequências reguladoras podem incluir promotores, intensificadores, operadores, repressores, sinais de terminação de transcrição, sequências indutoras de translação, íntrons, sequências de reconhecimento de poliadenilação, sítio de processamento de RNA, sítio de ligação efetor e estrutura de haste-alça.

[0146] O termo "promotor" se refere a uma sequência de ácido nucleico com capacidade de controlar a expressão de uma sequência de codificação ou RNA funcional. Em geral, uma sequência de codificação está localizada 3' a uma sequência de promotor. Os promotores podem ser derivados em sua integridade de um gene nativo ou ser compostos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores constatados na natureza ou mesmo compreender segmentos de ácido nucleico sintético. É

compreendido por aqueles versados na técnica que diferentes promotores podem direcionar a expressão de um gene em diferentes tecidos ou tipos de célula ou em diferentes estágios de desenvolvimento ou em resposta a diferentes condições ambientais ou fisiológicas. Os promotores que fazem com que um gene seja expresso na maioria dos tipos de célula na maioria das vezes são comumente referidos como "promotores constitutivos". "Promotores induzíveis", por outro lado, fazem com que um gene seja expresso quando o promotor for induzido ou acionado por um sinal específico de promotor ou molécula. Também é reconhecido que, visto que na maioria dos casos, os limites exatos de sequências reguladoras não foram completamente definidos, Os fragmentos de DNA de diferentes comprimentos podem ter atividade de promotor idêntica. Por exemplo, será compreendido que "promotor de FBA1" pode ser usado para se referir a um fragmento derivado da região promotora do gene FBA1.

[0147] O termo "terminador", conforme usado no presente documento, se refere às sequências de DNA localizadas a jusante de uma sequência de codificação. Isso inclui sequências de reconhecimento de poliadenilação e outros sinais reguladores de codificação de sequências com capacidade de afetar o processamento de mRNA ou expressão de gene. O sinal de poliadenilação é geralmente caracterizado por afetar a adição de tratos de ácido poliadenílico à terminação 3' do precursor de mRNA. A região 3' pode influenciar a transcrição, processamento de RNA ou estabilidade ou translação da sequência de codificação associada. É reconhecido que visto na maioria dos casos os limites exatos de sequências reguladoras não foram completamente definidos, os fragmentos de DNA de diferentes comprimentos podem ter atividade idêntica de terminador. Por exemplo, será compreendido que o "terminador CYC1" pode ser usado para se referir a um fragmento derivado da região de terminador do gene CYC1.

[0148] O termo "ligado de forma operável" se refere à associação de sequências de ácido nucleico em um único fragmento de ácido nucleico de modo que a função de um é afetada pelo outro. Por exemplo, um promotor é ligado de forma operável a uma sequência de codificação quando o mesmo tem capacidade de efetuar a expressão dessa sequência de codificação (isto é, que a sequência de codificação está sob o controle transcriptacional do promotor). As sequências de codificação podem ser ligadas de forma operável às sequências reguladoras em orientação senso ou antissenso.

[0149] O termo "expressão", conforme usado no presente documento, se refere à transcrição e acúmulo estável de RNA senso (mRNA) ou antissenso derivado do fragmento de ácido nucleico da invenção. A expressão também pode se referir à translação de mRNA em um polipeptídeo.

[0150] O termo "superexpressão", conforme usado no presente documento, se refere à expressão que é maior do que a expressão endógena do mesmo gene ou gene relacionado. Um gene heterólogo é superexpresso se sua expressão for maior do que aquela de um gene endógeno comparável. O termo superexpressão se refere a um aumento no nível de ácido nucleico ou proteína em uma célula hospedeira. Desse modo, a superexpressão pode resultar do aumento do nível de transcrição ou translação de uma sequência endógena em uma célula hospedeira ou pode resultar da introdução de uma sequência heteróloga em uma célula hospedeira.

[0151] A superexpressão também pode resultar do aumento da estabilidade de um ácido nucleico ou sequência de proteína.

[0152] Conforme usado no presente documento o termo "transformação" se refere à transferência de um fragmento de ácido nucleico no genoma de um micro-organismo hospedeiro, resultando em herança geneticamente estável. Os micro-organismos hospedeiros que contém os

fragmentos de ácido nucleico transformado são denominados como micro-organismos "transgênicos" ou "recombinantes" ou "transformados".

[0153] Os termos "plasmídeo", "vetor" e "cassete" se referem a um elemento cromossômico extra que frequentemente carregam genes que não são parte do metabolismo central da célula e geralmente na forma de fragmentos de DNA circulares de duplo filamento. Tais elementos podem ser sequências de replicação de forma autônoma, sequências de integração de genoma, sequências de fago ou nucleotídeo, linear ou circular, de um DNA ou RNA único ou de filamento duplo, derivado de qualquer fonte, na qual um número de sequências de nucleotídeo foi unido ou recombinado a uma única construção que tem capacidade de introduzir um fragmento promotor e sequência de DNA para um produto de gene selecionado junto à sequência não transladada 3' apropriada em uma célula. "Cassete de transformação" se refere a um vetor específico que contém um gene estrangeiro e tem elementos adicionalmente ao gene estrangeiro que facilita à transformação de uma célula hospedeira particular. O "cassete de expressão" se refere a um vetor específico que contém um gene estrangeiro e que tem elementos adicionalmente ao gene estrangeiro que permitem expressão intensificada desse gene em um hospedeiro estrangeiro.

[0154] O termo "biblioteca de saturação de sítio" se refere a uma biblioteca que contém substituições aleatórias em uma posição específica de aminoácido com até e incluindo todos os 20 possíveis aminoácidos de uma vez.

[0155] O termo "PCR propenso a erros" se refere à adição de erros aleatórios de cópia impondo-se condições de reação de PCR "descuidado" ou imperfeito que geram bibliotecas aleatórias de mutações em uma sequência específica de nucleotídeo.

[0156] Conforme usado no presente documento o termo "degeneração de códon" se refere à natureza no código genético que permite a variação da sequência de nucleotídeo sem afetar a sequência de aminoácido de um polipeptídeo codificado. O artesão versado está ciente do "desvio de códon" exibido por uma célula hospedeira específica em uso de códons de nucleotídeo para especificar um dado aminoácido. Portanto, ao sintetizar um gene para expressão aprimorada em uma célula hospedeira, é desejável projetar o gene de modo que sua frequência de uso de códon se aproxime da frequência de uso preferencial de códon da célula hospedeira.

[0157] O termo "otimizado por códon" conforme o mesmo se refere a genes ou regiões de codificação de moléculas de ácido nucleico para transformação de vários hospedeiros, se refere à alteração de códons no gene ou regiões de codificação das moléculas de ácido nucleico para refletir o uso típico de códon do organismo hospedeiro sem alterar o polipeptídeo codificado pelo DNA. Tal otimização inclui trocar pelo menos um ou mais de um ou um número significativo de códons por um ou mais códons que são mais frequentemente usados nos genes desse organismo.

[0158] Os desvios na sequência de nucleotídeo que compreendem os códons que codificam os aminoácidos de qualquer cadeia de polipeptídeo permitem variações na sequência que codifica o gene. Visto que cada códon consiste em três nucleotídeos e os nucleotídeos que compreendem DNA são restritos a quatro bases específicas, há 64 combinações possíveis de nucleotídeos, 61 dos quais codificam aminoácidos (os três códons remanescentes codificam sinais que encerram translação). O "código genético" que mostra quais códons codificam quais aminoácidos é reproduzido no presente documento como a Tabela 2A. Como resultado, muitos aminoácidos são projetados por mais de um códon. Por exemplo, os aminoácidos alanina e prolina são codificados por quatro tercetos, serina e arginina por seis,

enquanto o triptofano e metionina são codificados por somente um terceto. Essa degeneração permite que a composição de base de DNA varie em uma ampla faixa sem alterar a sequência de aminoácido das proteínas codificadas pelo DNA.

**TABELA 2A. O CÓDIGO GENÉTICO PADRÃO**

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTTC " TTTA Leu (L) TTG	TCT Ser (s) TCC " TCA" TCG"	TAT Tyr(Y) TAC " <b>Terminação</b> TAA <b>Terminação</b> TAG	TGT Cys(C) TGC <b>Terminação</b> TGA TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC " CTA " CTG "	CCT Pro (P) CCC " CCA " CCG "	CAT His (H) CAC " CAA Gin (Q) CAG "	CGT Arg (R) CGC " CGA " CGG "
A	ATT Ile (I) ATC " ATA " <b>ATG</b> Met (M)	ACT Thr (T) ACC " ACA " ACG "	AAT Asn (N) AAC " AAA Lys (K) AAG	AGT Ser (S) AGC " AGA Arg (R) AGG
G	GTT Val (V) GTC " GTA " GTG "	GCT Ala (A) GCC " GCA " GCG "	GAT Asp (D) GAC " GAA Glu (E) GAG "	GGT Gly (G) GGC " GGA " GGG "

[0159] Muitos organismos exibem um desvio para uso de códons particulares para código para inserção de um particular aminoácido em uma cadeia de peptídeo de cultivo. A preferência de Códon ou desvio de códon, diferenças no uso de códon entre organismos, permitida pela degeneração do código genético e é documentada em meio a muitos organismos. O desvio de códon frequentemente se correlaciona com a eficiência de translação de RNA (mRNA) mensageiro em que, por sua vez, acredita-se ser dependente, *inter alia*, as propriedades dos códons que são transladados e a disponibilidade das moléculas de RNA (tRNA) de transferência particular. A predominância de tRNAs selecionados em um célula é geralmente um reflexão dos códons usados mais frequentemente em síntese de peptídeo. Consequentemente, os genes podem ser adaptados à expressão de gene ideal em um dado organismo com base na otimização de códon.

[0160] Dado o grande número de sequências de gene disponíveis para uma ampla variedade de espécies de animais, vegetais e microbianas, é possível para calcular as frequências relativas de uso de códon. As Tabelas de uso de códon estão prontamente disponíveis, por exemplo, na "Base de dados de uso de códon" disponível em [www.kazusa.ou.jp/codon/](http://www.kazusa.ou.jp/codon/) (visitado em 20 de março de 2008) e essas tabelas podem ser adaptadas em um número de formas. Consulte Nakamura, Y., *et al. Nucl. Acids Res.* 28:292 (2000). As tabelas de uso de códon para levedura, calculadas a partir da liberação GenBank 128.0 [15 de fevereiro de 2002], são reproduzidas abaixo como a Tabela 2B. Essa tabela usa nomenclatura de mRNA e então ao invés de timina (T) que é constatada no DNA, as tabelas usam uracila (U) que é constatada no RNA. A Tabela 2B foi adaptada de modo que as frequências sejam calculadas para cada aminoácido, ao invés de para todos os 64 códons.

**TABELA 2B. TABELA DE USO DE CÓDON PARA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Aminoácido	Códon	Número	Frequência por milhar
Tyr	UAU	122726	18,8
Tyr	UAC	96596	14,8
His	CAU	89007	13,6
His	CAC	50785	7,8
Gln	CAA	178251	27,3
Gln	CAG	79121	12,1
Asn	AAU	233124	35,7
Asn	AAC	162199	24,8
Lys	AAA	273618	41,9
Lys	AAG	201361	30,8
Asp	GAU	245641	37,6
Asp	GAC	132048	20,2
Glu	GAA	297944	45,6
Glu	GAG	125717	19,2
Cys	UGU	52903	8,1
Cys	UGC	31095	4,8
Trp	UGG	67789	10,4

Aminoácido	Códon	Número	Frequência por milhar
Arg	CHU	41791	6,4
Arg	CGC	16993	2,6
Arg	CGA	19562	3,0
Arg	CGG	11351	1,7
Arg	AGA	139081	21,3
Arg	AGG	60289	9,2
Gly	GGU	156109	23,9
Gly	GGC	63903	9,8
Gly	GGA	71216	10,9
Gly	GGG	39359	6,0
Parada	UAA	6913	1,1
Parada	UAG	3312	0,5
Parada	UGA	4447	0,7

[0161] Utilizando essa tabela ou tabelas similares, alguém de habilidade comum na técnica pode aplicar as frequências a qualquer sequência de polipeptídeo dada e produzir um fragmento de ácido nucleico de um região de codificação otimizada por códon que codifica o polipeptídeo, mas que usa códons ideais para uma dada espécie.

[0162] A atribuição aleatória de códons em uma frequência otimizada para codificar uma dada sequência de polipeptídeo pode ser feita manualmente calculando-se as frequências de códon para cada aminoácido e então atribuindo-se os códons à sequência de polipeptídeo aleatoriamente. Adicionalmente, vários algoritmos e programas de software de computador são prontamente disponíveis àqueles de habilidade comum na técnica. Por exemplo, a função "EditSeq" no pacote de Lasergene, disponível de DNASTar, Inc., Madison, WI, a função de retrotranslação no Conjunto VetorNTI, disponível de InforMax, Inc., Bethesda, MD e a função de "retrotranslado" no pacote GCG-Wisconsin, disponível de Accelrys, Inc., San Diego, CA. Adicionalmente, vários recursos estão publicamente disponíveis para otimizar por códon as sequências de região de codificação, por exemplo, a função de "retrotranslação" em [www.entelechon.com/bioinformatics/backtranslation.php?lang=eng](http://www.entelechon.com/bioinformatics/backtranslation.php?lang=eng) (visitado em 15 de abril de 2008) e a função de "sequência de



retrotranslação" disponível em <http://bioinfo.pbi.nrc.ca:8090/EMBOSS/index.html> (visitado em 9 de julho de 2002). A construção de um algoritmo rudimentar para atribuir códons com base em uma dada frequência também pode ser facilmente concluída com funções matemáticas básicas por alguém de habilidade comum na técnica.

[0163] As regiões de codificação otimizadas por Códon podem ser projetadas por vários métodos conhecidos àqueles versados na técnica incluindo pacotes de software tais como "synthetic gene designer"([userpages.umbc.edu/~vyug1/codon/sgd/](http://userpages.umbc.edu/~vyug1/codon/sgd/), visitado em 19 de março de 2012).

[0164] Um polinucleotídeo ou fragmento de ácido nucleico tem "capacidade de hibridização" a outro fragmento de ácido nucleico, tal como um cDNA, DNA genômico ou molécula de RNA, quando uma forma de filamento único do fragmento de ácido nucleico pode se conformar ao outro fragmento de ácido nucleico sob as condições apropriadas de temperatura e força iônica de solução. As condições de hibridização e lavagem são conhecidas e exemplificadas em Sambrook, J., Fritsch, E. F. E Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989), particularmente capítulo 11 e Tabela 11.1 no mesmo (inteiramente incorporado ao presente documento a título de referência). As condições de temperatura e força iônica determinam a "rigidez" da hibridização. As condições de rigidez podem ser ajustadas para triagem de fragmentos moderadamente similares (tais como sequências homólogas de organismos remotamente relacionados), aos fragmentos altamente similares (tais como genes que duplicam enzimas funcionais a partir de organismos proximamente relacionados). As lavagens após a hibridização determinam as condições de rigidez. Um conjunto de condições usa um series de lavagens que se iniciam com 6X SSC, 0,5% em SDS em temperatura ambiente por 15 min, então

repetida com 2X de SSC, 0,5% em SDS a 45°C por 30 min e então repetida duas vezes com 0,2X de SSC, 0,5% em SDS a 50°C por 30 min. Outro conjunto de condições rígidas usa maiores temperaturas nas quais as lavagens são idênticas às aquelas acima exceto pelo fato de que a temperatura das duas últimas lavagens de 30 min em 0,2X de SSC, 0,5% em SDS foi aumentada para 60°C. Outro conjunto de condições altamente rígidas usa duas lavagens finais em 0,1X SSC, 0,1% em SDS a 65°C. Um conjunto adicional de condições rígidas inclui hibridização em 0,1X SSC, 0,1% em SDS, 65°C e lavagens com 2X SSC, 0,1% em SDS seguido por 0,1X SSC, 0,1% em SDS, por exemplo.

[0165] A hibridização exige que dois ácidos nucleicos contenham sequências complementares, apesar de depender da rigidez da hibridização, incompatibilidades entre bases são possíveis. A rigidez apropriada para hibridizar ácidos nucleicos depende do comprimento dos ácidos nucleicos e do grau de complementação, variáveis conhecidas na técnica. Quanto maior o grau de similaridade ou homologia entre duas sequências de nucleotídeo, maior o valor de  $T_m$  para híbridos de ácidos nucleicos que tem essas sequências. A estabilidade relativa (que corresponde ao maior  $T_m$ ) de hibridizações de ácido nucleico diminui na seguinte ordem: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Para híbridos de mais do que 100 nucleotídeos de comprimento, as equações para calcular  $T_m$  foram derivadas (consulte Sambrook *et al.*, supra, 9.50 9.51). Para hibridizações com menores ácidos nucleicos, isto é, oligonucleotídeos, a posição de incompatibilidades se torna mais importante e o comprimento do oligonucleotídeo determina sua especificação (consulte Sambrook *et al.*, supra, 11.7 11.8). Em uma realização, o comprimento de um ácido nucleico com capacidade de hibridização é pelo menos cerca de 10 nucleotídeos. Em uma realização, um comprimento mínimo de um ácido nucleico com capacidade de hibridização é de pelo menos cerca de 15 nucleotídeos; pelo menos cerca de 20 nucleotídeos; ou o comprimento é

de pelo menos cerca de 30 nucleotídeos. Ademais, o artesão versado reconhecerá que a temperatura e concentração de sal de solução de lavagem podem ser ajustados conforme necessário de acordo com fatores tais como comprimento da sonda.

[0166] Conforme usado no presente documento, o termo "polipeptídeo" é destinado a abranger um "polipeptídeo" singular assim como plural "polipeptídeos", e se refere a uma molécula composta de monômeros (aminoácidos) ligada de forma linear por ligações de amida (também conhecidas como ligações de peptídeo). O termo "polipeptídeo" se refere a qualquer cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos e não se refere a um comprimento específico do produto. Desse modo, os peptídeos, dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos, "proteína", "cadeia de aminoácido", ou qualquer outro termo usado para se referir a uma cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos, estão incluídos dentro da definição de "polipeptídeo", e o termo "polipeptídeo" pode ser usado ao invés de ou de forma intercambiável com quaisquer desses termos. Um polipeptídeo pode ser derivado de uma fonte biológica natural ou produzido por tecnologia recombinante, mas não é necessariamente transladado de uma sequência de ácido nucleico projetada. O mesmo pode ser gerado de qualquer maneira, incluindo por síntese química.

[0167] Por um polipeptídeo "isolado" ou um fragmento, variante ou derivados do mesmo, é destinado um polipeptídeo que não está em sua meio natural. Nenhum nível particular de purificação é exigido. Por exemplo, um polipeptídeo isolado pode ser removido de seu ambiente nativo ou natural. De forma recombinante, polipeptídeos produzidos e as proteínas expressas nas células hospedeiras são considerados isolados para os fins da invenção, à medida que são polipeptídeos nativos ou recombinantes que foram separados, fracionados ou parcial ou substancialmente purificados por qualquer técnica adequada.

[0168] Conforme usado no presente documento, os termos "variante" e "mutante" são sinônimos e se referem a um polipeptídeo que difere de um polipeptídeo especificamente citado por uma ou mais inserções, deleções, mutações e substituições criadas de aminoácido que usam, por exemplo, técnicas de DNA recombinante, tais como mutagênese. A orientação ao determinar quais resíduos de aminoácidos podem ser trocados, adicionados ou deletados sem abolir atividades de interesse pode ser constatada comparando-se a sequência do polipeptídeo particular com aquela dos polipeptídeos homólogos, por exemplo, de levedura ou bacteriana e minimizando-se o número de mudanças de sequência de aminoácido feitas em regiões de alta homologia (regiões conservadas) ou trocando os aminoácidos com sequências de consenso.

[0169] "Polipeptídeo projetado", conforme usado no presente documento, se refere a um polipeptídeo que é sintético, isto é, difere de alguma maneira de um polipeptídeo constatado na natureza.

[0170] De forma alternativa, variantes de polinucleotídeo recombinante que codifica esses mesmos polipeptídeos ou polipeptídeos similares podem ser sintetizadas ou selecionadas por meio de uso da "redundância" no código genético. Várias substituições de códon, tais como mudanças silenciosas que produzem vários sítios de restrição, podem ser introduzidas para otimizar a clonagem em um plasmídeo ou vetor viral para expressão. As mutações na sequência de polinucleotídeo podem ser refletidas no polipeptídeo ou domínios de outros peptídeos adicionados ao polipeptídeo para modificar as propriedades de qualquer parte do polipeptídeo. Por exemplo, mutações podem ser usadas para reduzir ou eliminar expressão de uma proteína alvo e incluem, porém, sem limitação, deleção do gene inteiro ou uma porção do gene, inserir um fragmento de DNA no gene (tanto no promotor como na região de codificação) de modo que a proteína não seja expressa ou

expressa em níveis inferiores, introduzir uma mutação na região de codificação que adiciona um códon de terminação ou deslocamento de quadro de modo que uma proteína funcional não seja expressa e introduzir uma ou mais mutações na região de codificação para alterar os aminoácidos de modo que uma proteína não funcional ou uma proteína menos ativa de forma enzimática seja expressa.

[0171] As “substituições” de aminoácido podem ser o resultado de trocas de um aminoácido por outro aminoácido que tem propriedades estruturais e/ou químicas similares, isto é, trocas de aminoácido conservativo ou as mesmas podem ser o resultado de troca de um aminoácido por um aminoácido que tem diferentes propriedades estruturais e/ou químicas, isto é, trocas de aminoácido não conservativo. As substituições de aminoácido “conservativo” podem ser feitas com base em similaridade em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade ou a natureza anfipática dos resíduos envolvidos. Por exemplo, aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina; aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina; aminoácidos positivamente carregados (básicos) incluem arginina, lisina e histidina; e aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. De forma alternativa, substituições de aminoácido “não-conservativo” podem ser feitas selecionando as diferenças em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade ou a natureza anfipática de qualquer desses aminoácidos. “Inserções” ou “deleções” podem estar dentro da faixa de variação conforme estrutural ou funcionalmente tolerados pelas proteínas recombinantes. A variação permitida pode ser determinada de forma experimental criando-se sistematicamente inserções, deleções ou substituições de aminoácidos em uma molécula de polipeptídeo que usa técnicas de DNA

recombinante e avaliando as variantes recombinantes resultantes para atividade.

[0172] Uma "porção substancial" de um aminoácido ou sequência de nucleotídeo é aquela porção que compreende o suficiente da sequência de aminoácido de um polipeptídeo ou da sequência de nucleotídeo de um gene para identificar de forma putativa esse polipeptídeo ou gene, tanto por avaliação manual da sequência por alguém versado na técnica ou por comparação de sequência automatizada por computador e identificação com uso de algoritmos tais como BLAST (Altschul, S. F., *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 identificar de forma putativa um polipeptídeo ou sequência de ácido nucleico como homóloga a uma proteína ou gene conhecido. Ademais, em relação a sequências de nucleotídeo, sondas de oligonucleotídeo específico de gene que compreendem 20 a 30 nucleotídeos contíguos podem ser usados em métodos dependentes de sequência de identificação de gene (por exemplo, hibridização Southern) e isolamento (por exemplo, hibridização *in situ* de colônias bacterianas ou placas bacteriófagas). Adicionalmente, oligonucleotídeos curtos de 12 a 15 bases podem ser usados como Iniciadores de amplificação em PCR de modo a obter um fragmento particular de ácido nucleico que compreende os Iniciadores. Consequentemente, uma "porção substancial" de uma sequência de nucleotídeo compreende o suficiente da sequência para identificar e/ou isolar especificamente um fragmento de ácido nucleico que compreende a sequência. O presente relatório descritivo ensina o aminoácido completo e a sequência de nucleotídeo que codifica proteínas particulares. O artesão versado que tem o benefício das sequências conforme relatado no presente documento, pode agora usar todas ou uma porção substancial das sequências reveladas para os fins conhecidos àqueles versados nesta técnica. Consequentemente, a

presente invenção compreende as sequências completas conforme relatado na listagem de sequência anexa, assim como porções substanciais dessas sequências conforme definido acima.

[0173] O termo "complementar" é usado para descrever a relação entre bases de nucleotídeo que têm capacidade de se hibridizarem uma à outra. Por exemplo, em relação a DNA, a adenina é complementar à timina e a citosina é complementar à guanina e em relação ao RNA, a adenina é complementar à uracila e a citosina é complementar à guanina.

[0174] O termo "percentual de identidade", conforme conhecido na técnica, é uma relação entre duas ou mais sequências de polipeptídeo ou duas ou mais sequências de polinucleotídeo, conforme determinado comparando-se as sequências. Na técnica, "identidade" também significa o grau de relacionamento de sequência entre o polipeptídeo ou as sequências de polinucleotídeo, conforme o caso pode ser, conforme determinado pela compatibilidade entre séries de tais sequências. "Identidade" e "similaridade" podem ser prontamente calculadas por métodos conhecidos, incluindo, porém, sem limitação, aqueles descritos em 1.) Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University: NY (1988); 2.) Biocomputing: Informatics e Genoma Projects (Smith, D. W., Ed.) Academic: NY (1993); 3.) Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, U. M. E Griffin, H. G., Eds.) Humana: NJ (1994); 4.) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987); e 5.) Sequence Analysis Iniciador (Gribskov, M. E Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991).

[0175] Os métodos para determinar uma identidade são projetados para proporcionar a melhor correspondência entre as sequências testadas. Os métodos para determinar uma identidade e uma similaridade são codificados em programas de computador publicamente disponíveis. Os cálculos de alinhamentos de sequência e de identidade percentual podem ser

realizados com o uso do programa MegAlign(TM) do conjunto de computação de bioinformáticas LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Os múltiplos alinhamentos das sequências são realizados com o uso do método de alinhamento Clustal que abrange muitas variedades do algoritmo que inclui o método de alinhamento Clustal V que corresponde ao método de alinhamento rotulado Clustal V (descrito por Higgins e Sharp, CABIOS. 5:151 a 153 (1989); Higgins, D.G. *et al.*, Comput. Appl. Biosci., 8:189 a 191 (1992)) e encontrado no programa MegAlign(TM) do conjunto de computação de bioinformáticas LASERGENE (DNASTAR Inc.). Para múltiplos alinhamentos, os valores padrão correspondem a GAP PENALTY=10 e GAP LENGTH PENALTY=10. Os parâmetros padrão para alinhamentos em pares e para um cálculo de identidade percentual de sequências de proteína com o uso do método Clustal são KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 e DIAGONALS SAVED=5. Para ácidos nucleicos esses parâmetros são KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 e DIAGONALS SAVED=4. Após um alinhamento das sequências com o uso do programa Clustal V, é possível obter um percentual de identidade vendo-se a tabela de distâncias de sequência no mesmo programa. De modo adicional o método de alinhamento Clustal W é disponível e corresponde ao método de alinhamento rotulado Clustal W (descrito por Higgins e Sharp, CABIOS. 5:151 a 153 (1989); Higgins, D.G. *et al.*, Comput. Appl. Biosci. 8:189-191 (1992)) e encontrado no programa MegAlign(TM) v6.1 do conjunto de computação de bioinformáticas LASERGENE (DNASTAR Inc.). Os parâmetros padrão para um alinhamento múltiplo (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,2, Delay Divergen Seqs(%)=30, DNA Transition Weight=0,5, Protein Weight Matrix=Gonnet Series, DNA Weight Matrix=IUB). Após um alinhamento das sequências com o uso do programa Clustal W, é possível obter um percentual de identidade vendo-se a tabela de distâncias de sequência no mesmo programa.



[0176] É bem conhecido por uma pessoa versada na técnica que muitos níveis de identidade de sequência são úteis para identificar polipeptídios, tais como de outras espécies, em que tais polipeptídios têm a mesma função ou atividade ou similares, ou para descrever os polinucleotídeos correspondentes. Exemplos úteis de identidades percentuais incluem, mas não são limitados a: 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%, ou qualquer porcentagem de número inteiro de 55% a 100% pode ser útil para descrever a presente invenção, tais como 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 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 polinucleotídeo adequados não apenas têm as homologias acima, mas normalmente compreendem um polinucleotídeo que tem pelo menos 50 nucleotídeos, pelo menos 100 nucleotídeos, pelo menos 150 nucleotídeos, pelo menos 200 nucleotídeos ou pelo menos 250 nucleotídeos. Ainda, os fragmentos de polinucleotídeo adequados que têm as homologias acima codificam um polipeptídeo que tem pelo menos 50 aminoácidos, pelo menos 100 aminoácidos, pelo menos 150 aminoácidos, pelo menos 200 aminoácidos ou pelo menos 250 aminoácidos.

[0177] O termo software de análise de sequência refere-se a qualquer algoritmo de computador ou programa de software que é útil para a análise de sequências de nucleotídeo ou de aminoácido. Um software de análise de sequência pode ser comercialmente disponível ou desenvolvido de modo independente. Um software de análise de sequência normal irá incluir, mas não é limitado a: 1.) o conjunto de programas GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2.) BLASTP, BLASTN, BLASTX (*Altschul et al., J. Mol. Biol.*, 215:403 a 410 (1990)); 3.) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison, WI); 4.) Sequencher (Gene Codes

Corporation, Ann Arbor, MI); e 5.) o programa FASTA que incorpora o algoritmo Smith-Waterman (W. R. Pearson, *Comput. Methods Genome Res.*, [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111 a 20. Editor(s): Suhai, Sandor. Plenum: Nova Iorque, NY). Dentro do contexto deste pedido de patente será entendido que onde um software de análise de sequência é usado para análise, os resultados da análise terão como base os valores padrão do programa referido, a menos que seja especificado de outra maneira. Conforme usado no presente documento, valores padrão irá significar qualquer conjunto de valores ou de parâmetros que originalmente carregam com o software quando primeiro inicializado.

[0178] As técnicas de DNA recombinante padrão e de clonagem molecular são bem conhecidas na técnica e são descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) (doravante no presente documento "Maniatis"); e por Silhavy, T. J., Bennis, 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 adicionais usados aqui estão em *Methods in Enzymology*, Volume 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology* (Parte A, 2004, Christine Guthrie e Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA). Outras técnicas e ferramentas moleculares são conhecidas na técnica e incluem uma junção sobrepondo-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) de extensão (Yu, *et al.* (2004) *Fungal Genet. Biol.* 41 :973 a 981), seleção positiva para mutações no local *URA3* de *Saccharomyces cerevisiae* (Boeke, J.D. *et al.* (1984) *Mol. Gen. Genet.* 197, 345 a 346; M A Romanos, *et al.* *Nucleic Acids Res.* 11 de janeiro de 1991; 19(1): 187), o sistema de recombinação sítio-específica cre-lox assim

como sítios de mutante lox e mutações de substrato FLP (Sauer, B. (1987) *Mol Cell Biol* 7:2.087 a 2.096; Senecoff, *et al.* (1988) *Journal of Molecular Biology*, volume 201, edição 2, páginas 405 a 421; Albert, *et al.* (1995) *The Plant Journal*. volume 7, edição 4, páginas 649 a 659), deleção contínua de gene (Akada, *et al.* (2006) *Levedura*; 23(5):399 a 405), e metodologia de reparo de vão (Ma *et al.*, *Genetics* 58:201 a 216; 1981).

[0179]As manipulações genéticas de uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento podem ser realizadas com o uso de técnicas genéticas padrão e de triagem e podem ser feitas em qualquer célula hospedeira que seja adequada para manipulação genética (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pg. 201 a 202).

[0180]Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode ser qualquer hospedeiro de levedura ou de fungo útil para modificação genética e expressão de gene recombinante que inclua aquelas leveduras mencionadas em outro lugar no presente documento, tal como na tabela 7. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser um membro dos gêneros *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Dekkera*, *Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Torulaspora*, *Hanseniaspora*, *Kluveromyces*, *Yarrowia* e algumas espécies de *Candida*.

#### **POLIPEPTÍDIOS COM ATIVIDADE DE KARI**

[0181]Em algumas realizações, as células hospedeiras recombinantes e os métodos fornecidos no presente documento endereçam uma necessidade que surge na produção microbiana de isobutanol em que a enzima KARI realiza um papel vital. Na via biossintética de isobutanol mostrada na Figura 1, o substrato para uma conversão de produto de acetolactato para diidroxiiisovalerato (DHIV) é catalizado pela enzima KARI. Os polipeptídios que

têm uma atividade de cetol-ácido redutoisomerase que são membros do clado SLSL de KARIs são revelados na publicação de pedido de patente nº U.S.2011/0244536 e incorporada a título de referência. Os polipeptídios que têm uma atividade de KARI revelados no presente documento foram constatados como sendo eficazes para produção de isobutanol. O clado SLSL de KARIs inclui as mesmas enzimas de KARI listadas na tabela 3.

**TABELA 3. KARIs EFICAZES**

Descrição	ID de SEQ NO: ácido nucleico	ID de SEQ NO: Aminoácido
<i>Staphylococcus capitis</i> SK14	66	67
<i>Staphylococcus epidermidis</i> M23864-W1	68	69
<i>Staphylococcus hominis</i> SK119	134	135
<i>Staphylococcus aureus</i> subespécie <i>Aureus</i> TCH130	70	71
<i>Staphylococcus warneri</i> L37603	72	73
<i>Staphylococcus epidermidis</i> W23144	74	75
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subespécie <i>Staphylococcus</i> ATCC15305	76	77
<i>Staphylococcus carnosus</i> subespécie <i>Carnosus</i> TM300	78	79
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	80	81
<i>Listeria grayi</i> DSM 20601	82	83
<i>Enterococcus casseliflavus</i> EC30	84	85
<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2	86	87
<i>Macrococcus caselyticus</i> JCSC5402	88	89
<i>Streptococcus vestibulares</i>	90	91
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	92	93
<i>Streptococcus gordonii</i> str. <i>cgakkus</i> sybcepa CH1	94	95
<i>Streptococcus suis</i> 89/1591	96	97
<i>Streptococcus infantarius</i> subespécie <i>infantarius</i> ATCC BAA-102	98	99
<i>Lactococcus lactis</i> subespécie <i>cremoris</i> MG1363	100	101
<i>Lactococcus lactis</i>	102	103
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> A TCC8293	104	105
<i>Lactobacillus buchneri</i> ATCC 11577	106	107
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435	108	109
<i>Staphylococcus epidermidis</i> A TCC 12228	110	111
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CGSP14	112	113
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	114	115
<i>Streptococcus sanguinis</i> SK36	116	117
<i>Streptococcus salivarius</i> SK126	118	119
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	120	121
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CCRI1974M2	122	123
<i>Lactococcus lactis</i> subespécie <i>lactis</i> 111403	124	125
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i> A TCC 19254	126	127
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	128	129
<i>Lactobacillus brevis</i> subespécie <i>gravesensis</i> ATCC27305	130	131
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> NCD02118	132	133

[0182] Conforme descrito e demonstrado no presente documento, os requerentes constataram enzimas de KARI adicionais e variantes das KARIs adicionais que resultam em produção de isobutanol comparável a mesma observada com a Kari de *Lactococcus lactis* e/ou que excede a mesma. Tais enzimas de KARI e variantes resultam em uma titulação de isobutanol comparável ou maior e/ou uma produtividade de isobutanol eficaz em comparação às mesmas observadas com a KARI de *Lactococcus lactis* nas mesmas condições. Consequentemente, em realizações, os polipeptídios que têm uma atividade de KARI que funcionam em uma via de produção de isobutanol têm uma titulação de isobutanol e/ou uma produtividade de isobutanol eficaz comparável à mesma com a KARI de *Lactococcus lactis* ou melhor do que a mesma (SEQ ID NO: 380).

[0183] Tais polipeptídios que têm uma atividade de KARI podem desse modo ser adequados para produção de isobutanol. Será apreciado que com o uso de uma combinação de informações estruturais e de sequência disponíveis na técnica, os polipeptídios que compreendem uma atividade de KARI e menos do que 100% de identidade com as sequências exemplificadas podem ser construídas para uso em vias biossintéticas de isobutanol. Por exemplo, as estruturas de cristal da enzima KARI de *E. coli* em uma resolução de  $\alpha$  2.6 foi solucionada (Tyagi, *et al.*, Protein Sci., 14: 3.089 a 3.100, 2005) assim como a estrutura da KARI de *P. aeruginosa* (Ahn, *et al.*, J. Mol. Biol., 328: 505 a 515, 2003) e a enzima KARI de espinafre (Biou V., *et al.* The EMBO Journal, 16: 3.405 a 3.415, 1997). Além do mais, é descrito no presente documento um HMM de perfil (fornecido no presente documento; tabela Z) preparado com o uso de sequências de aminoácido de 25 proteínas de KARI com uma função verificada de modo experimental conforme delineado na tabela 1. As KARIs foram de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Sulfolobus solfataricus* P2, *Pyrobaculum aerophilum* cepa IM2, *Natronomonas pharaonis*

DSM 2160, *Bacillus subtilis* subespécie *subtilis* cepa 168, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Phaeosporium molischianum*, *Ralstonia solanacearum* GMI1000, *Zymomonas mobilis* subespécie *mobilis* ZM4, *Alkalilimnicola ehrlichei* MLHE-, *Campylobacter lari* RM2100, *Marinobacter aquaeolei* VT8, *Psychrobacter arcticus* 273-4, *Hahella chejuensis* KCTC 2396, *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259, *Azotobacter vinelandii* AvOP, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cepa DC3000, *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas entomophila* L48, *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Bacillus cereus* ATCC 10987, *Bacillus cereus* ATCC 10987 e *Spinacia oleracea*. Espera-se que qualquer proteína que correlacione o HMM de perfil com um valor E de  $<10^{-3}$  com o uso de um programa *hmmsearch* no pacote HMMER seja uma KARI funcional.

[0184] Acredita-se que uma produção de isobutanol utiliza a via de glicólise presente no microrganismo hospedeiro. Durante a produção de duas moléculas de piruvato de glicose durante uma glicólise, há uma produção líquida de duas moléculas de NADH de NAD<sup>+</sup> pela reação gliceraldeído-3-fostato desidrogenase. Durante a produção adicional de uma molécula de isobutanol de duas moléculas de piruvato, há um consumo líquido de uma molécula de NAD(P)H, pela reação de KARI, e uma molécula de NAD(P)H pela reação desidrogenase de isobutanol. A interconversão de NADH com NADPH é geralmente lenta e ineficiente em levedura; desse modo, o NADPH a ser consumido é gerado por metabolismo (por exemplo, pela via pentose fosfato) e consome substrato no processo. Enquanto isso, a célula tenta manter uma homeostase na relação NAD<sup>+</sup>/NADH, o que leva ao NADH em excesso produzido em uma produção de isobutanol que é consumida em redução de desperdício de outros intermediários metabólicos; por exemplo, pela produção de glicerol (Bakker, *et al.*, 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH

metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 25: 15 a 37). Desse modo, um desequilíbrio entre NADH produzido e NADPH consumido pela via de isobutanol pode levar a uma redução no rendimento molar de isobutanol produzido de glicose em duas maneiras: 1) operação desnecessária de metabolismo para produzir NADPH, e 2) uma reação de desperdício de intermediários metabólicos para manter uma homeostase de NAD<sup>+</sup>/NADH. Os polipeptídios que têm uma atividade de KARI que funcionam bem em uma via de isobutanol e têm um baixo K<sub>M</sub> para NADH podem ser usados para aprimorar a produção de isobutanol.

[0185] Também revelada no presente documento são as substituições para as sequências de enzima KARI fornecidas na tabela 3 e na tabela 10 para produzir variantes com uma habilidade variante para utilizar NADH como um cofator. Tais variantes fornecem alternativas que podem ser empregadas para otimizar a eficiência de uma via biossintética utilizando uma KARI, tal como uma via biossintética de isobutanol, para condições de produção em particular. Uma produção de isobutanol sob condições trocadas de aeróbica para anaeróbica para variantes da enzima K9 de KARI derivada de *Anaerostipes caccae* com habilidades diferentes para utilizar NADH é demonstrada nos exemplos. Desse modo, equipado com essa revelação, uma pessoa de habilidade na técnica poderá produzir células hospedeiras recombinantes que compreendem uma enzima KARI de clado SLSL, ou uma enzima KARI *Enterococcus gallinarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subespécie *cremoris* MG 1363, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium dentium* ou *Anaerostipes caccae*, *Lactococcus lactis* ou uma variante ou um fragmento ativo dos mesmos adequados para uma faixa de condições de produção.

[0186] Em algumas realizações, é fornecido no presente documento um polipeptídio que tem uma atividade de KARI e tem pelo menos

cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com uma enzima KARI da tabela 3 ou da tabela 10, ou os exemplos 16, 17, 21 e que tem um  $K_M$  para NADH menor do que cerca de 300  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  ou 5  $\mu\text{M}$ . Em algumas realizações, é fornecido no presente documento um polipeptídeo projetado que tem uma atividade de KARI e que tem pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade com uma enzima KARI da tabela 3, da tabela 10 ou dos exemplos 16, 17, 21. Em algumas realizações, tais polipeptídios têm um  $K_M$  para NADH menor do que o mesmo da enzima nativa correspondente. Em algumas realizações, a relação de  $K$  para NADH com  $K_M$  para NADPH é menor do que 0,1, em algumas realizações é menor do que 1, em algumas realizações é menor do que 2 e em algumas realizações é menor do que 4.

[0187] As enzimas de KARI e as variantes das mesmas que são particularmente adequadas para produção de isobutanol incluem, mas não são limitadas a, variantes de um cetol-ácido redutoisomerase de *Anaerostipes caccae* DSM 14662 (SEQ ID NO: 643): "K9G9" (SEQ ID NO: 644) e "K9D3" (SEQ ID NO: 645) que tem um  $K$  para NADH menor do que o mesmo da enzima nativa (SEQ ID NO: 643).

[0188] As células hospedeiras fornecidas no presente documento podem compreender um polipeptídeo que tem uma atividade de cetol-ácido redutoisomerase. Nas realizações, tais polipeptídios têm pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com SEQ ID NO: 643, um variante ativo do mesmo; ou uma KARI derivada de *Anaerostipes caccae* DSM 14662 ou um variante ativo do mesmo. Nas



realizações, os polipeptídios têm pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com SEQ ID NO: 645 ou 644. Nas realizações, os polipeptídios compreendem SEQ ID NO: 645 ou 644.

[0189] Em algumas realizações, os polipeptídios que têm uma atividade de KARI compreendem pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 419 [JB4P], 427 [SB2], e todas essas variantes listadas na tabelas 25 e 26. Tais variantes fornecem alternativas para otimizar a eficiência da via biossintética de isobutanol para condições de produção em particular. A produção de isobutanol sob condições é demonstrada nos exemplos.

#### **IDENTIFICAÇÃO DE POLIPEPTÍDIOS ADICIONAIS QUE TÊM UMA ATIVIDADE DE KARI**

[0190] Uma triagem por biodiversidade de genes codificantes de KARI de várias espécies de bactérias e de fungos que revelaram KARIs adequadas para produção de isobutanol é revelada no exemplo 1. Equipado com essa revelação, uma pessoa de habilidade na técnica poderá prontamente identificar os polipeptídios adequados adicionais que têm uma atividade de KARI.

[0191] As sequências de outros polinucleotídeos, genes e/ou polipeptídios podem ser identificadas na literatura e em banco de dados de bioinformáticos bem conhecidas pela pessoa versada que usa as sequências reveladas no presente documento e disponíveis na técnica. Por exemplo, tais sequências podem ser identificadas através de uma pesquisa do tipo BLAST de bases de dados publicamente disponíveis com sequências de polinucleotídeo ou de polipeptídio fornecidas no presente documento. Em tal método, as identidades podem ter como base o método de alinhamento Clustal

W com o uso dos parâmetros padrão de GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0.1 e séries de matriz de peso de proteína Gonnet 250.

[0192] De modo adicional, as sequências de polinucleotídeo e de polipeptídeo reveladas no presente documento podem ser usadas para identificar outros homólogos de KARI em natureza. Por exemplo, cada um dentre os fragmentos de ácido nucleico codificantes de KARI revelados no presente documento pode ser usado para isolar genes que codificam proteínas homólogas. Um isolamento de genes homólogos com o uso de protocolos dependentes de sequência é bem conhecido na técnica. Os exemplos de protocolos dependentes de sequência incluem, mas não são limitados a (1) métodos de hibridização de ácido nucleico; (2) métodos de amplificação de DNA e RNA, conforme exemplificado por vários usos de tecnologias de amplificação de ácido nucleico [por exemplo, uma reação em cadeia da polimerase (PCR), Mullis *et al.*, documento de patente nº U.S. 4.683.202; reação em cadeia da ligase (LCR), Tabor *et al.*, Proc. Acad. Sci. USA 82:1074 (1985); ou amplificação de deslocamento de filamento (SDA), Walker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:392 (1992)]; e (3) métodos de construção de biblioteca e triagem por complementação.

[0193] Será apreciado que uma pessoa de habilidade comum na técnica, equipado com essa revelação, pode gerar fragmentos ativos de polipeptídeos fornecidos no presente documento, por exemplo, truncando-se os polipeptídeos fornecidos no presente documento com base em alinhamentos de sequência no terminal-N e confirmando-se uma atividade de KARI. Nas realizações, as KARIs de *Anaerostipes caccae* e variantes da mesma fornecidas no presente documento são truncadas no terminal-N. Em uma realização, até os primeiros cinco aminoácidos, inclusive os mesmos, são truncadas de um polipeptídeo fornecido no presente documento. Nas realizações, o polipeptídeo é SEQ ID NO: 27 ou uma variante do mesmo. Em

uma realização, um polipeptídio que tem uma atividade de KARI compreende SEQ ID NO: 635, 637 (codificada pelas sequências de polinucleotídeo SEQ ID NO: 636 e 638, respectivamente), K9\_Annabel\_SH (SEQ ID NO:862, SEQ ID NO:863 de proteína) e K9\_Zeke\_SH (SEQ ID NO: 860, SEQ ID NO: 861 de proteína) ou qualquer variante listada na tabela 40.

#### **DIMINUIR $K_M$ PARA NADH**

[0194] Conforme mostrado na Figura 2 e nos exemplos, as mutações nas posições que correspondem a 50, 52 e 53, e opcionalmente 47, da KARI de *Pseudomonas fluorescens* na enzima KARI de *Anaerostipes caccae* resulta em KARIs com  $K_M$  para NADH diminuído em comparação com um tipo selvagem, verificando que as mutações nessas posições produzem NADH que aceita variantes de KARIs altamente eficazes. Mutações adicionais de KARI de *Anaerostipes caccae* revelaram posições que diminuem adicionalmente o  $K_M$  para NADH.

[0195] Conforme demonstrado no presente documento (consultar os exemplos), uma substituição de aminoácidos na região de ligação de fosfato, particularmente em duas ou mais posições que correspondem às posições 47, 50, 52, e 53 de KARI de PF5 (SEQ ID NO: 5) resulta em um  $K_M$  para NADH diminuído. Portanto, os polipeptídios derivados de um organismo listado no presente documento, por exemplo, nas tabelas 3 e 10 que têm uma atividade de KARI e que compreendem substituições em pelo menos duas dentre as quatro posições que correspondem às posições 47, 50, 52 e 53 de KARI de PF5 em comparação com a sequência de aminoácido nativa, são fornecidos. Os polipeptídios que têm uma atividade de KARI e que compreendem substituições na região de ligação de fosfato são fornecidos no presente documento. Os polipeptídios que têm uma atividade de KARI e que compreendem substituições em posições que correspondem a S56 e S58 de KARI de K9 (SEQ ID NO: 27) são fornecidos no presente documento. Em

algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a S56 é A. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a S58 é D ou E. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a S53 é Q, E, P ou A. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a S56 é V ou D. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a S58 é D ou Q. Nas realizações, os polipeptídios compreendem adicionalmente uma substituição em uma ou mais posições que correspondem a I86, N87, N107, T131 ou T191 de KARI de K9 (SEQ ID NO: 27). Em algumas realizações, os polipeptídios compreendem uma substituição em pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4 ou em todas as posições indicadas. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a I86 é T ou V. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a N87 é P. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a N107 é S. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a T131 é C, L, A, M ou V. Em algumas realizações, a substituição na posição que corresponde a T191 é A, S, D, C ou G.

[0196] Nas realizações, os polipeptídios compreendem menos do que 10, 15 ou 20 substituições em relação à sequência do tipo selvagem. Nas realizações, os polipeptídios correspondem ao HMM de perfil com base nas KARIs verificadas de modo experimental e dado na tabela Z com um valor E menor do que  $< 10^{-3}$ . As sequências podem ser comparadas ao HMM de perfil dado na tabela Z com o uso de hmmsearch (pacote de software HMMER disponível por Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA).

[0197] Os polipeptídios adicionais que têm uma atividade de KARI e um  $K_M$  para NADH diminuído podem ser obtidos com o uso dos métodos descritos e demonstrados no presente documento. Por exemplo, um polipeptídio que tem uma atividade de KARI pode ser empregado na construção de uma biblioteca de gene de saturação em sítio conforme descrito

no presente documento. Os kits para uma construção de tais bibliotecas de gene são comercialmente disponíveis (por exemplo, por USB Corporation, Cleveland, OH, #78480). As mutagêneses direcionadas a sítio podem também ser realizadas com o uso de kits comercialmente disponíveis (por exemplo, o kit de mutagênese direcionada a sítio QuickChange II XL, Catálogo #200524, Stratagene, La Jolla, CA). Um projeto de iniciador para sítios alvo para mutagênese é bem conhecido na técnica e um alinhamento múltiplo de sequência para identificar os sítios alvo é bem conhecido do mesmo modo.

[0198] Uma vez que as variantes foram geradas, uma atividade de KARI com NADH ou NADPH pode ser prontamente avaliada com o uso de métodos conhecidos na técnica e/ou revelada no presente documento. Por exemplo, uma atividade de KARI pode ser determinada medindo-se o desaparecimento do NADPH ou do NADH da reação em 340 nm ou mediante determinação da constante de Michaelis por meio de uma medição de formação de 2,3-diidroxiisovalerato com o uso de HPLC/MS. Do mesmo modo, uma produção de isobutanol a partir de uma cepa que compreende variantes pode ser confirmada.

#### **ESPECIFICIDADE DE COFATOR**

[0199] Para determinar uma especificidade de cofator, as relações  $V_{\text{máx}}/K_M$  podem ser calculadas para cada cofator ao saturar um acetolactato; essas variantes com uma relação maior para NADH irão reagir em uma taxa maior com NADH do que com NADPH sob condições de concentrações molares equivalentes dos dois cofatores e ao saturar um acetolactato. Os valores  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  para NADH e NADPH podem ser determinados com o uso de métodos conhecidos na técnica e/ou fornecidos no presente documento (consultar o exemplo 16). Por exemplo, para determinar os valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  para NADH e NADPH, as proteínas parcialmente purificadas podem ser avaliadas em várias concentrações de NADH e de NADPH.

[0200] Conforme demonstrado no presente documento (consultar os exemplos 16 e 18 e a Figura 8), uma substituição de aminoácidos adicionais em K9G9 resulta em variantes que têm uma especificidade aumentada para NADH. Desse modo, os polipeptídios que compreendem uma substituição em uma ou mais dentre as posições que correspondem a K57, Y53, e E74 de KARI de K9 (SEQ ID NO: 27) são fornecidos no presente documento. Também fornecidos no presente documento são os polipeptídios que compreendem substituições em uma ou mais dentre as posições que correspondem a Y53, K57, E74, N87 e K90, ou todas as mesmas. Nas realizações, a substituição na posição que corresponde a Y53 é F. Nas realizações, a substituição na posição que corresponde a K57 é E. Nas realizações, a substituição na posição que corresponde a E74 é G. Nas realizações, a substituição na posição que corresponde a N87 é P. Nas realizações, a substituição na posição que corresponde a K90 é M ou L. Nas realizações, as variantes compreendem substituições de pelo menos uma posição que corresponde a S56 ou S58 da SEQ ID NO: 27 e compreendem adicionalmente pelo menos uma, pelo menos duas, pelo menos três ou mais do que três substituições adicionais que correspondem às posições da SEQ ID NO: 27 identificada no presente documento.

[0201] Nas realizações, os polipeptídios compreendem menos do que 2, 3, 4, 5, 10, 15 ou 20 substituições em relação à sequência do tipo selvagem. Nas realizações, os polipeptídios que correspondem ao HMM de perfil com base nas KARIs verificadas de modo experimental e dadas na tabela Z com um valor E menor do que  $< 10^{-3}$ .

[0202] Conforme demonstrado nos exemplos, as variantes de K9SB2 (SEQ ID NO: 427) foram geradas e submetidas a triagem para variantes com uma afinidade de NADPH reduzida, revelando posições adicionais para substituição. Desse modo, em realizações, os polipeptídios

ainda compreendem substituições em uma ou mais posições que correspondem a F53, G55, A56, W59, F67, I84, L85, Q91, M94, e P135 of SEQ ID NO: 427. Nas realizações, a substituição na posição G55 é D ou C, a substituição na posição Q91 é L, a substituição na posição A56 é T ou V, a substituição em P135 é S, a substituição na posição F53 é L, a substituição na posição M94 é I, a substituição na posição F67 é L ou I, a substituição na posição W59 é C, a substituição na posição I84 é L e a substituição na posição L85 é M.

### **ESTRUTURA DE KARI**

[0203] As informações estruturais úteis na identificação e na modificação dos polipeptídios que têm uma atividade de KARI são fornecidas na técnica, tal como nas referências descritas aqui assim como no HMM de perfil fornecido em conjunto no presente documento na tabela Z e nas publicações de pedido de patente nºs U.S. 20100197519 e U.S. 20090163376, incorporadas no presente documento a título de referência.

[0204] Foi relatado que os átomos de oxigênio p2' fosfato de NADPH de ligações de hidrogênio com cadeias laterais de Arg162, Ser165 e Ser167 de KARI de espinafre (Biou V., *et al.* The EMBO Journal, 16: 3.405 a 3.415, 1997). Studies by Ahn *et al.*, (J. Mol. Biol., 328: 505 a 515, 2003) identificaram três sítios de ligação de fosfato de NADPH (Arg47, Ser50 e Thr52) para *Pseudomonas aeruginosa* (KARI de PAO) seguido de uma comparação de sua estrutura com a mesma da KARI de espinafre. A estrutura de KARI de PF5 com íons de magnésio, acetolactato e de NADPH ligados foi construída com base na estrutura em cristal da KARI de *P. aeruginosa* PAO1 (PDB ID 1 NP3, Ahn H. J. *et al.*, J. Mol. Biol., 328: 505 a 515, 2003) que tem 92% de homologia de sequência de aminoácido com a KARI de PF5. A estrutura da KARI PAO1 é um homododecâmero e cada dodecâmero consiste em seis homodímeros com uma interface de dímero extensiva. O sítio ativo de

KARI é localizado nessa interface de dímero. O conjunto biológico é formado por seis homodímeros posicionados nas bordas de um tetraedro resultando em um dodecâmero altamente simétrico de simetria de grupo de 23 pontos.

[0205] O modelo de dímero de KARI de PF5 foi construído com base nas coordenadas de monômero A e de monômero B de KARI de PAO1 e uma sequência de KARI de PF5 com o uso do DeepView/visualizador Swiss PDB (Guex, N. e Peitsch, M.C., *Electrophoresis*, 18: 2.714 a 2.723, 1997). Esse modelo foi então importado para programar O (Jones, T.A. *et al.*, *Acta Crystallogr. A* 47: 110 a 119, 1991) em um sistema Silicon Graphics para uma modificação adicional.

[0206] A estrutura da KARI de PAO1 não tem NADPH, substrato, inibidor ou magnésio no sítio ativo. Portanto, a estrutura da KARI de espinafre (PDB ID 1yve, Biou V. *et al.*, *The EMBO Journal*, 16: 3.405 a 3.415, 1997), que tem íons de magnésio, NADPH e um inibidor (N-hidróxi-N-isopropiloxamato) no sítio de ligação de acetolactato, foi usada para modelar essas moléculas no sítio ativo. A KARI de planta tem uma homologia de sequência muito pequena tanto para a KARI de PF5 quanto para a KARI de PAO1 (<20% de identidade de aminoácido), no entanto as estruturas na região de sítio ativo dessas duas enzimas de KARI são muito similares. Para sobrepor o sítio ativo dessas duas estruturas de KARI, os comandos LSQ\_ext, LSQ\_improve e LSQ\_mol no programa O foram usados para colocar em linha o sítio ativo de monômero A de KARI de espinafre com o monômero A do modelo de KARI de PF5. As coordenadas de NADPH, dois íons de magnésio e o inibidor ligados no sítio ativo de KARI de espinafre foram extraídos e incorporados na molécula A de KARI de PF5. Um conjunto das coordenadas dessas moléculas foi gerado para o monômero B de KARI de PF5 aplicando-se o operador de transformação do monômero A para o monômero B calculado pelo programa.



[0207] Pelo fato de que não há NADPH no sítio ativo de uma estrutura de cristal de KARI de PAO1, as estruturas da região de alça de ligação de fosfato no sítio de ligação de NADPH (resíduos 44 a 45 na KARI de PAO1, 157 a 170 na KARI de espinafre) são muito diferentes entre as duas. Para modelar a forma ligada de NADPH, o modelo da alça de ligação de fosfato da KARI de PF5 (44 a 55) foi substituído pelo mesmo de 1yve (157 a 170). Qualquer discrepância de cadeias laterais entre esses dois foi convertido para aquele na sequência de KARI de PF5 com o uso do comando `mutate_replace` no programa O e as conformações das cadeias laterais substituídas foram manualmente ajustadas. Todo o modelo de KARI de PF5 dimérico ligado por inibidor/Mg/NADPH foi submetido a um ciclo de minimização de energia com o uso do programa CNX (ACCELRY S San Diego CA, Burnger, AT. e Warren, G.L., Acta Crystallogr., D 54: 905 a 921, 1998) após o qual o inibidor foi substituído pelo substrato, acetolactato (AL), no modelo.

### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL**

[0208] As células hospedeiras fornecidas no presente documento podem compreender um polipeptídeo que tem uma atividade de cetol-ácido redutoisomerase. Conforme descrito e demonstrado no presente documento, os requerentes constataram enzimas de KARI adicionais e variantes das KARIs adicionais que resultam em uma produção de isobutanol comparável a mesma observada com a KARI de *Lactococcus lactis* e/ou que excede a mesma (consultar os exemplos). Consequentemente, nas realizações, os polipeptídeos que têm uma atividade de KARI que funcionam em uma via de produção de isobutanol têm uma produtividade eficaz de isobutanol e/ou produzem isobutanol em uma titulação comparável à mesma com a KARI de *Lactococcus lactis* ou melhor do que a mesma (SEQ ID NO: 380). Tais polipeptídeos são desse modo considerados como sendo úteis para uma produção de isobutanol,

particularmente em células que compreendem as vias de produção de isobutanol descritas no presente documento. Nas realizações, os polipeptídios fornecidos no presente documento têm uma produtividade eficaz de isobutanol e/ou produzem isobutanol em uma titulação maior do que a titulação observada com a KARI de *Lactococcus lactis* (SEQ ID NO. 380) ou quase igual a mesma sob as mesmas condições. Nas realizações, os polipeptídios fornecidos no presente documento têm uma produtividade eficaz de isobutanol maior do que cerca de 3 gramas por grama de células, maior do que cerca de 4, maior do que cerca de 5 ou maior do que cerca de 6 gramas por grama de células após cerca de 48 horas em que pelo menos as últimas cerca de 24 horas dentre as 48 horas estão sob condições anaeróbicas.

[0209] Além do mais, os requerentes constataram que as variantes dos polipeptídios que têm uma atividade de KARI descrita acima, inclusive as mesmas com K para NADH menor do que a mesma do polipeptídio não substituído, fornecem vantagens para uma produção de isobutanol sob condições anaeróbicas. Embora não desejado ser limitado por teoria, acredita-se que tais variantes fornecem uma produção de isobutanol aprimorada devido a um uso mais eficaz de NADH como equivalentes de redução. Nas realizações, uma produção de isobutanol que emprega tal variante fornece um acúmulo de glicerol reduzido. Nas realizações, a relação molar de isobutanol para glicerol é aumentada por uma variante de um polipeptídio que tem uma atividade de KARI descrita acima com  $K_M$  para NADH menor do que a mesma do polipeptídio não substituído. Nas realizações, a relação molar de isobutanol para glicerol é maior do que 1. Nas realizações, a relação molar de isobutanol para glicerol é maior do que 2. Nas realizações, a relação molar é maior do que 3. Nas realizações, a relação molar é maior do que 4, maior do que 5, maior do que 6, maior do que 7, maior do que 8, maior do que 9, maior do que 10, maior do que 12 ou maior do que 14. Nas realizações, a relação molar está na faixa

de cerca de 1 a 5, cerca de 1 a 10, cerca de 2 a 8, cerca de 5 a 10, cerca de 5 a 15, cerca de 10 a 15 ou cerca de 12 a 15.

[0210] Conforme demonstrado nos exemplos no presente documento, como a especificidade bioquímica para o cofator de NADH conforme definido por  $(\text{NADH } V_{\text{máx}}/K_M)/(\text{NADPH } V_{\text{máx}}/K_M)$  aumenta, há um aumento observado na relação isobutanol/glicerol, o que sugere que a especificidade de cofator alterada levou a uma utilização de NADPH diminuída e uma formação de subproduto.

#### **MODIFICAÇÃO DE ALDEÍDO DESIDROGENASE**

[0211] Nas realizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante pode compreender uma atividade de aldeído desidrogenase reduzida ou eliminada e uma via biossintética de isobutanol em que a célula hospedeira produz butanol. Em outras realizações, a célula hospedeira recombinante pode compreender um isobutanol ou uma via biossintética de 1-butanol conforme descrito adicionalmente no presente documento. Em outras realizações, a via biossintética de isobutanol pode compreender um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que catalisa um substrato para uma conversão de produto selecionado dentre o grupo que consiste em: (a) piruvato para acetolactato; (b) acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato; (c) 2,3-diidroxiisovalerato para 2-cetoisovalerato; (d) 2-cetoisovalerato para isobutiraldeído; e (e) isobutiraldeído para isobutanol. Em outras realizações, a via biossintética de isobutanol pode compreender polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos que têm uma atividade de acetolactato sintase, de cetol-ácido redutoisomerase, de ácido diidróxi desidratase, de cetoisovalerato descarboxilase e de álcool desidrogenase. Em outras realizações, a célula recombinante compreende uma via biossintética de 1-butanol. Em outras realizações, a via biossintética de 1-butanol compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que catalisa um substrato para uma conversão de

produto selecionado dentre o grupo que consiste em: (a) acetil-CoA para acetoacetil-CoA; (b) acetoacetil-CoA para 3-hidroxiacetoil-CoA; (c) 3-hidroxiacetoil-CoA para crotonil-CoA; (d) crotonil-CoA para butiril-CoA; (e) butiril-CoA para butiraldeído; (f) butiraldeído para 1-butanol. Em outras realizações, a via biossintética de 1-butanol pode compreender polinucleotídeos que codificam os polipeptídios que têm uma atividade.

[0212] Nas realizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante pode compreender uma modificação ou perturbação de um polinucleotídeo ou um gene que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase ou uma modificação ou perturbação de um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase. Muitos métodos para modificação genética e perturbação de genes alvo para reduzir ou eliminar uma expressão são conhecidos por uma pessoa de habilidade comum na técnica e podem ser usados para criar uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento. Em outras realizações, a célula hospedeira recombinante pode compreender uma deleção, uma mutação e/ou uma substituição em um gene ou polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase ou em um polipeptídio endógeno que tem uma atividade de aldeído desidrogenase. Tais modificações, perturbações, deleções, mutações e/ou substituições podem resultar em uma atividade de aldeído desidrogenase que é reduzida ou eliminada que é reduzida ou eliminada. As modificações que podem ser usadas incluem, mas não são limitadas a, uma deleção de todo o gene ou de uma porção do gene que codifica uma proteína de aldeído desidrogenase, inserir um fragmento de DNA no gene de codificação (seja no promotor ou na região de codificação) de modo que a proteína não é expressa ou é expressa em níveis menores, introduzir uma mutação na região de codificação que adiciona um códon de terminação ou uma mudança de estrutura de modo que uma

proteína funcional não seja expressa, e introduzir uma ou mais mutações na região de codificação para alterar aminoácidos de modo que uma proteína menos ativa ou não funcional seja expressa. Em outras realizações, uma expressão de um gene alvo pode ser bloqueada através de uma expressão de um RNA antissenso ou um RNA interferente, e construtos podem ser introduzidos que resultam em cossupressão. Em outras realizações, a síntese ou a estabilidade do transcrito pode ser diminuída através de mutação. Nas realizações, a eficiência pela qual a proteína é traduzida de mRNA pode ser modulada através de mutação. Todos esses métodos podem ser prontamente praticados por uma pessoa versada na técnica que faz uso das sequências de codificação conhecidas ou identificadas de proteínas alvo.

[0213] Em outras realizações, as sequências de DNA que cercam uma sequência de codificação de aldeído desidrogenase alvo são também úteis em alguns procedimentos de modificação e são disponíveis, por exemplo, para leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae* na sequência completa de genoma coordenada pelo Genome Project ID9518 de Genome Projects coordenado pelo NCBI (Centro Nacional para Informações de Biotecnologia) com identificação GOPID #13838. Um exemplo adicional não limitante de sequências genômicas de levedura é o de *Candida albicans*, que é incluída nos GPID #10771, #10701 e #16373. Outras sequências genômicas de levedura podem ser prontamente encontradas por uma pessoa de habilidade na técnica em bancos de dados publicamente disponíveis.

[0214] Em outras realizações, as sequências de DNA que cercam uma sequência de codificação de aldeído desidrogenase alvo podem ser úteis para os métodos de modificação que usam recombinação homóloga. Em um exemplo não limitante desse método, as sequências de divisa de gene de aldeído desidrogenase podem ser colocadas de modo a limitar um gene marcador selecionável para mediar uma recombinação homóloga através da

qual o gene marcador substitui o gene de aldeído desidrogenase. Em outro exemplo não limitante, as sequências de gene de aldeído desidrogenase parciais e as sequências de divisa de gene de aldeído desidrogenase que limitam um gene marcador selecionável podem ser usadas para mediar uma recombinação homóloga através da qual o gene marcador substitui uma porção do gene de aldeído desidrogenase alvo. Nas realizações, o marcador selecionável pode ser limitado por sítios de recombinação específicos em sítio, de modo que após uma expressão da recombinase específica em sítio correspondente, o gene de resistência é extirpado do gene de aldeído desidrogenase sem reativar o último. Nas realizações, a recombinação específica em sítio deixa para trás um sítio de recombinação que perturba uma expressão da proteína de aldeído desidrogenase. Em outras realizações, o vetor de recombinação homólogo pode ser construído para também deixar a deleção no gene de aldeído desidrogenase após uma extirpação do marcador selecionável, conforme é bem conhecido por uma pessoa versada na técnica.

[0215] Em outras realizações, as deleções podem ser feitas em um gene alvo de aldeído desidrogenase com o uso de recombinação mitótica conforme descrito por Wach *et al.* (Yeast, 10:1.793 a 1.808; 1994). Tal método pode envolver uma preparação de um fragmento de DNA que contém um marcador selecionável entre regiões genômicas que podem ser tão pequenas quanto 20 bp, e que limita uma sequência de DNA alvo. Em outras realizações, esse fragmento de DNA pode ser preparado por amplificação de PCR do gene de marcador selecionável usando como Iniciadores os oligonucleotídeos que hibridizam até as extremidades do gene marcador e que incluem as regiões genômicas que podem recombinar com o genoma de levedura. Nas realizações, o fragmento de DNA linear pode ser eficientemente transformado em levedura e recombinado no genoma resultando em uma substituição de gene inclusive com uma deleção da sequência de DNA alvo (((conforme

revelado, por exemplo, em *Methods in Enzymology*, Volume 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology* (Parte A, 2004, Christine Guthrie e Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA)).

[0216] Ademais, métodos de substituição de promotor podem ser usados para trocar os elementos de controle de transcrição endógenos permitindo que outros meios modulem uma expressão tal como descrito por Mnaimneh *et al.*, ((2004) *Cell* 118(1): 31 a 44).

[0217] Em outras realizações, a atividade codificada de gene alvo de aldeído desidrogenase pode ser perturbada com o uso de mutagênese aleatória, que pode então ser seguida de uma triagem para identificar cepas com atividade reduzida ou substancialmente eliminada. Nesse tipo de método, a sequência de DNA da região de codificação de gene alvo, ou qualquer outra região do genoma que afeta uma dependência de substrato de carbono por crescimento, não precisa ser conhecida. Nas realizações, uma triagem por células com uma atividade de aldeído desidrogenase reduzida ou outros mutantes que têm uma atividade de aldeído desidrogenase reduzida podem ser úteis para as células hospedeiras recombinantes da invenção.

[0218] Os métodos para criar mutações genéticas são comuns e bem conhecidos na técnica e podem ser aplicados no exercício de criar mutantes. Os métodos de modificação genética aleatória normalmente usados (revisado em *Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) incluem mutagênese espontânea, mutagênese causada por genes mutadores, mutagênese química, irradiação com UV ou raios X ou mutagênese de transposon.

[0219] A mutagênese química de células hospedeiras pode envolver, mas não é limitado a, um tratamento com um dentre os mutagens de DNA a seguir: metanossulfato de etila (EMS), ácido nítrico, sulfato de dietila ou N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (MNNG). Tais métodos de mutagênese

foram revisados em Spencer *et al.* (Mutagenesis in Yeast, 1996, Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ). Nas realizações, a mutagênese química com EMS pode ser realizada conforme revelado em Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Uma irradiação com luz ultravioleta (UV) ou raios X também pode ser usado para produzir mutagênese aleatória em células de levedura. O efeito primário de mutagênese por irradiação UV é a formação de dímeros de pirimidina que perturbam a fidelidade de uma replicação de DNA. Os protocolos para mutagênese por UV de levedura podem ser encontrados em Spencer *et al.* (Mutagenesis in Yeast, 1996, Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ). Nas realizações, a introdução de um fenótipo mutador pode também ser usado para gerar mutações cromossômicas aleatórias em células hospedeiras. Nas realizações, os fenótipos mutadores comuns podem ser obtidos através de uma perturbação de um ou mais dentre os genes a seguir: PMS1, MAG1, RAD18 ou RAD51. Em outras realizações, uma restauração do fenótipo não mutador pode ser obtida mediante inserção do alelo do tipo selvagem. Em outras realizações, as coleções de células modificadas produzidas a partir de qualquer um dentre esses e outros processos de mutagênese aleatória conhecidos podem ser submetidas a triagem para uma atividade de aldeído desidrogenase reduzida ou eliminada.

[0220] Os genomas foram completamente sequenciados e anotados e são publicamente disponíveis para as cepas de levedura a seguir: *Ashbya gossypii* ATCC 10895, *Candida glabrata* CBS 138, *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140, *Pichia stipitis* CBS 6054, *Saccharomyces cerevisiae* S288c, *Schizosaccharomyces pombe* 972h- e *Yarrowia lipolytica* CLIB122. Normalmente o BLAST (descrito acima) que procura de bases de dados publicamente disponíveis com sequências de polipeptídio ou polinucleotídeo de



aldeído desidrogenase conhecidas, tal como as mesmas fornecidas no presente documento, é usado para identificar sequências de codificação de aldeído desidrogenase de outras células hospedeiras, tal como células de levedura.

[0221] Em outras realizações, um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode catalisar a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico. Em outras realizações, a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico em uma célula hospedeira recombinante é reduzida ou eliminada. Em ainda outras realizações, um polinucleotídeo, um gene ou um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode corresponder ao número de comissão de enzima EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 e/ou EC 1.2.1.5.

[0222] Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante da invenção pode ser *S. cerevisiae*, e um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6 ou combinações dos mesmos. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *Kluyveromyces lactis* e um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser KLLA0F00440, KLLA0E23057, KLLA0D10021, KLLA0D09999G ou combinações dos mesmos. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *Pichia stipitis* e um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD7 ou combinações dos mesmos. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *Lactobacillus plantarum* e um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser AldH. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *E. coli* e um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser aldA, aldB, aldH ou combinações dos mesmos.

[0223] Em realizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante pode ser *S. cerevisiae* e um gene ou um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6 ou combinações dos mesmos. Em realizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante pode ser *S. cerevisiae* e um gene ou um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser ALD6. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *Kluyveromyces lactis*, e um gene ou um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser KLLA0F00440, KLLA0E23057, KLLA0D10021, KLLA0D09999G ou combinações dos mesmos. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *Pichia stipitis* e um gene ou um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD7 ou combinações dos mesmos. Nas realizações, o polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase é um homólogo de ALD6 de *Saccharomyces cerevisiae*. As cepas de deleção de *S. cerevisiae* que contêm deleções de gene de aldeído desidrogenase com um cassete kanMX são comercialmente disponíveis por American Type Culture Collection [catálogo #4000753].

[0224] Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *Lactobacillus plantarum* e um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser AldH. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *E. coli* e um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser aldA, aldB, aldH ou combinações dos mesmos.

[0225] Exemplos de polinucleotídeos, de genes e de polipeptídios de aldeído desidrogenase que podem ser alvejados para uma modificação ou uma inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas não são limitados a, aqueles da tabela 4 a seguir.

**TABELA 4. PROTEÍNAS E REGIÕES DE CODIFICAÇÃO DE GENE ALVO DE ALDEÍDO**

**DESIDROGENASE.**

	SEQ ID NO de ácido nucleico	SEQ ID NO de aminoácido
ALD2 de <i>S. cerevisiae</i>	732	733
ALD3 de <i>S. cerevisiae</i>	734	735
ALD4 de <i>S. cerevisiae</i>	736	737
ALD5 de <i>S. cerevisiae</i>	738	739
ALD6 de <i>S. cerevisiae</i>	740	741
KLLA0F00440 de <i>Kluyveromyces lactis</i>	742	743
KLLA0E23057 de <i>Kluyveromyces lactis</i>	744	745
KLLA0D10021 de <i>Kluyveromyces lactis</i>	746	747
KLLA0D09999 de <i>Kluyveromyces lactis</i>	748	749
ALD2 de <i>Pichia stipitis</i>	750	751
ALD3 de <i>Pichia stipitis</i>	752	753
ALD4 de <i>Pichia stipitis</i>	754	755
ALD5 de <i>Pichia stipitis</i>	756	757
ALD7 de <i>Pichia stipitis</i>	758	759
aldA de <i>E. coli</i>	760	761
aldB de <i>E. coli</i>	762	763
aldH (puuC) de <i>E. coli</i>	764	765

[0226] Outros exemplos de polinucleotídeos, de genes e de polipeptídios de aldeído desidrogenase que podem ser alvejados para uma modificação ou uma inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas não são limitados a, os polinucleotídeos, os genes e/ou os polipeptídios de aldeído desidrogenase que têm pelo menos cerca de 70% a cerca de 75%, cerca de 75% a cerca de 80%, cerca de 80% a cerca de 85%, cerca de 85% a cerca de 90%, cerca de 90% a cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98% ou cerca de 99% de identidade de sequência em relação a qualquer uma dentre as sequências da tabela 4, em que tal polinucleotídeo ou gene codifica, ou tal polipeptídio tem, uma atividade de aldeído desidrogenase. Ainda outros exemplos de polinucleotídeos, de genes e de polipeptídios de aldeído desidrogenase que podem ser alvejados para uma modificação ou uma inativação em uma célula

hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas não são limitados a uma variante, um fragmento ou um derivado ativo de qualquer uma dentre as sequências da tabela 4, em que tal polinucleotídeo ou gene codifica, ou tal polipeptídeo tem, uma atividade de aldeído desidrogenase.

[0227] Nas realizações, as sequências de outros polinucleotídeos, genes e/ou polipeptídios de aldeído desidrogenase podem ser identificadas na literatura e em banco de dados de bioinformáticos bem conhecidos pela pessoa versada que usa as sequências reveladas no presente documento e disponíveis na técnica. Por exemplo, tais sequências podem ser identificadas através de uma pesquisa do tipo BLAST de bases de dados publicamente disponíveis com as sequências de polinucleotídeo e de polipeptídeo de codificação de aldeído desidrogenase conhecidas. Em tal método, as identidades podem ter como base o método de alinhamento Clustal W com o uso dos parâmetros padrão de GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0.1 e séries de matriz de peso de proteína Gonnet 250.

[0228] De modo adicional, as sequências de polinucleotídeo e de polipeptídeo de aldeído desidrogenase reveladas no presente documento ou conhecidas na técnica podem ser usadas para identificar outros homólogos de aldeído desidrogenase na natureza. Por exemplo, cada um dentre os fragmentos de ácido nucleico que codificam aldeído desidrogenase revelados no presente documento podem ser usados para isolar os genes que codificam proteínas homólogas. Um isolamento de genes homólogos com o uso de protocolos dependentes de sequência é bem conhecido na técnica. Exemplos de protocolos dependentes de sequência incluem, mas não são limitados a (1) métodos de hibridização de ácido nucleico; (2) métodos de amplificação de DNA e RNA, conforme exemplificado por vários usos de tecnologias de amplificação de ácido nucleico [por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR), Mullis *et al.*, documento de patente nº U.S. 4.683.202; reação em

cadeia da ligase (LCR), Tabor et al., Proc. Acad. Sci. USA 82:1074 (1985); ou amplificação de deslocamento de filamento (SDA), Walker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:392 (1992)]; e (3) métodos de construção de biblioteca e triagem por complementação.

[0229] Consequentemente, está dentro do escopo da invenção fornecer os polinucleotídeos, os genes e os polipeptídios de aldeído desidrogenase que têm pelo menos cerca de 70% a cerca de 75%, cerca de 75% a cerca de 80%, cerca de 80% a cerca de 85%, cerca de 85% a cerca de 90%, cerca de 90% a cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98% ou cerca de 99% de identidade de sequência em relação a qualquer um dentre os polinucleotídeos ou os polipeptídios de aldeído desidrogenase revelados no presente documento (por exemplo, SEQ ID NOs: 732 a 765 da tabela 4). As identidades têm como base o método de alinhamento Clustal W com o uso dos parâmetros padrão de GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0.1 e séries de matriz de peso de proteína Gonnet 250.

[0230] A modificação de aldeído desidrogenase em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento para reduzir ou eliminar uma atividade de aldeído desidrogenase pode ser confirmada com o uso de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, uma perturbação de um aldeído desidrogenase em particular pode ser confirmada com uma triagem de PCR com o uso de Iniciadores internos e externos ao gene de aldeído desidrogenase ou por Southern blot com o uso de uma sonda projetada para a sequência de gene de aldeído desidrogenase. De modo alternativo, uma pessoa pode utilizar espectroscopia de massa, cromatografia a gás ou cromatografia líquida para fazer uma triagem das cepas expostas a isobutiraldeído para uma formação diminuída de ácido isobutírico. Consequentemente, um método de triagem para cepas com uma formação de ácido isobutírico diminuída é fornecido no presente documento, que

compreende: a) fornecer uma cepa que compreende uma modificação em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase e/ou uma modificação em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído oxidase; b) colocar em contato a célula com isobutiraldeído; e c) medir uma formação de ácido isobutírico; em que uma formação de ácido isobutírico é reduzida em comparação com uma cepa de controle sem a modificação. Em algumas realizações, a modificação é uma deleção, uma mutação e/ou uma substituição. Em algumas realizações, a medição é realizada com o uso de espectroscopia de massa - cromatografia a gás. Em algumas realizações, o ácido isobutírico é reduzido em pelo menos cerca de 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90%. Em algumas realizações, uma formação de ácido isobutírico é substancialmente eliminada.

#### **MODIFICAÇÃO DE ALDEÍDO OXIDASE**

[0231] Nas realizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode ter uma modificação ou perturbação de um polinucleotídeo, gene ou polipeptídio que codifica aldeído oxidase. Nas realizações, a célula hospedeira recombinante compreende uma deleção, uma mutação e/ou uma substituição em um gene ou um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído oxidase ou em um polipeptídio endógeno que tem uma atividade de aldeído oxidase. Tais modificações, perturbações, deleções, mutações e/ou substituições podem resultar em uma atividade de aldeído oxidase que é reduzida ou eliminada.

[0232] Em realizações da invenção, um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído oxidase pode catalisar a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico. Em outras realizações, a conversão de isobutiraldeído para

ácido isobutírico em uma célula hospedeira recombinante é reduzida ou eliminada. Em outras realizações, um polinucleotídeo, gene ou polipeptídio que tem uma atividade de aldeído oxidase pode corresponder ao número de comissão de enzima EC 1.2.3.1.

[0233] Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante da invenção pode ser *Pichia stipitis* e um polinucleotídeo, gene ou polipeptídio que tem uma atividade de aldeído oxidase pode ser AOX1 e/ou AOX2.

[0234] Exemplos de polinucleotídeos, genes e polipeptídios de aldeído oxidase que podem ser alvejados para uma modificação ou uma inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas não são limitados a, aqueles da tabela 5 a seguir.

**TABELA 5. PROTEÍNAS E REGIÕES DE CODIFICAÇÃO DE GENE ALVO DE ALDEÍDO**

<b><u>OXIDASE.</u></b>		
	SEQ ID NO: de ácido nucleico	SEQ ID NO: de aminoácido
AOX1 de <i>Pichia stipitis</i>	864	866
AOX2 de <i>Pichia stipitis</i>	867	868

[0235] Outros exemplos de polinucleotídeos, de genes e de polipeptídios de aldeído oxidase que podem ser alvejados para uma modificação ou uma inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas não são limitados a, os polinucleotídeos, os genes e/ou os polipeptídios de aldeído oxidase que têm pelo menos cerca de 70% a cerca de 75%, cerca de 75% a cerca de 80%, cerca de 80% a cerca de 85%, cerca de 85% a cerca de 90%, cerca de 90% a cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98% ou cerca de 99% de identidade de sequência em relação a qualquer uma dentre as sequências da tabela 5, em que tal polinucleotídeo ou gene codifica um polipeptídio que tem, ou tal polipeptídio que tem, uma atividade de aldeído oxidase. Ainda outros exemplos de polinucleotídeos, de genes e de polipeptídios de aldeído oxidase que podem ser alvejados para uma modificação ou uma inativação em uma

célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas não são limitados a uma variante, um fragmento ou um derivado ativo de qualquer uma dentre as sequências da tabela 5, em que tal polinucleotídeo ou gene codifica, ou tal polipeptídeo tem, uma atividade de aldeído oxidase.

[0236] Nas realizações, um polinucleotídeo, um gene e/ou um polipeptídeo que codifica uma sequência de aldeído oxidase revelada no presente documento ou conhecida na técnica pode ser modificada, conforme revelado acima para acetolactato redutase ou aldeído desidrogenase. Em outras realizações, um polinucleotídeo, um gene e/ou um polipeptídeo que codifica aldeído oxidase podem ser usadas para identificar outra sequência de polinucleotídeo, de gene e/ou de polipeptídeo de aldeído oxidase e/ou podem ser usadas para identificar um homólogo de aldeído oxidase em outras células, conforme revelado acima para aldeído desidrogenase. Tais sequências de codificação de aldeído oxidase podem ser identificadas, por exemplo, na literatura e/ou em banco de dados de bioinformáticos bem conhecidos pela pessoa versada. Por exemplo, a identificação de uma sequência de codificação de aldeído oxidase em outro tipo de célula com o uso de bioinformáticos pode ser completado através de uma pesquisa BLAST (conforme revelado acima) de bases de dados publicamente disponíveis com um DNA de codificação de hexose quinase e uma sequência de polipeptídeo conhecidos, tal como qualquer um dentre os mesmos fornecidos no presente documento. As identidades têm como base o método de alinhamento Clustal W com o uso dos parâmetros padrão de GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0.1 e séries de matriz de peso de proteína Gonnet 250.

[0237] A modificação de aldeído oxidase em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento para reduzir ou eliminar uma atividade de aldeído oxidase pode ser confirmada com o uso de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, uma perturbação de um aldeído



oxidase em particular pode ser confirmada com uma triagem de PCR com o uso de Iniciadores internos e externos ao gene de aldeído oxidase ou por Southern blot com o uso de uma sonda projetada para a sequência de gene de aldeído oxidase. De modo alternativo, uma pessoa pode utilizar cromatografia a gás ou outros métodos analíticos para fazer uma triagem das cepas expostas a isobutiraldeído para uma formação diminuída de ácido isobutírico (conforme descrito e demonstrado nos exemplos). Em algumas realizações, o ácido isobutírico é reduzido em pelo menos cerca de 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90%. Em algumas realizações, uma formação de ácido isobutírico é substancialmente eliminada.

[0238] Os requerentes forneceram células hospedeiras recombinantes que compreendem uma atividade de aldeído desidrogenase e/ou de aldeído oxidase reduzida ou eliminada. Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode compreender adicionalmente uma modificação em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de piruvato descarboxilase e/ou uma modificação em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem uma atividade hexoquinase 2. Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante da invenção pode produzir uma produção de uma via biossintética (por exemplo, isobutanol) e pode compreender um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que catalisa um substrato para uma conversão de produto selecionado dentre o grupo que consiste em: (a) piruvato para acetolactato; (b) acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato; (c) 2,3-diidroxiisovalerato para 2-cetoisovalerato; (d) 2-cetoisovalerato para isobutiraldeído; e (e) isobutiraldeído para isobutanol. Em outras realizações, tal célula hospedeira recombinante pode produzir um produto de uma via biossintética (por exemplo, isobutanol) em um rendimento ou uma quantidade que é maior do que o rendimento ou a

quantidade do mesmo produto produzido por uma célula hospedeira recombinante que não compreende uma atividade de uma atividade de aldeído desidrogenase e/ou de aldeído oxidase reduzida ou eliminada. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante da invenção pode reduzir ou eliminar a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico, e pode ser usada para triagem de polipeptídios candidatos que têm uma atividade de aldeído desidrogenase e/ou de aldeído oxidase. Assim sendo, os requerentes também forneceram métodos para aumentar o rendimento ou a titulação de um produto de uma via biossintética (por exemplo, isobutanol), métodos para reduzir ou eliminar a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico e métodos para triagem de polipeptídios candidatos que têm uma atividade de aldeído desidrogenase e/ou de aldeído oxidase.

[0239] Em realizações da invenção, são fornecidos os métodos para produzir uma célula hospedeira recombinante que compreendem (a) fornecer uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento; e (b) transformar a dita célula hospedeira com um polinucleotídeo que codifica um polipeptídio de uma via biossintética (por exemplo, uma via biossintética de isobutanol). Em outras realizações, são fornecidos os métodos para produzir uma célula hospedeira recombinante que compreendem (a) fornecer uma célula hospedeira recombinante que compreende uma modificação em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase ou em um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído desidrogenase; e (b) transformar a dita célula hospedeira com um polinucleotídeo que codifica um polipeptídio de uma via biossintética (por exemplo, uma via biossintética de isobutanol). Em outras realizações, são fornecidos os métodos para produzir uma célula hospedeira recombinante que compreendem (a) fornecer uma célula hospedeira recombinante que compreende uma modificação em um polinucleotídeo que codifica um

polipeptídio que tem uma atividade de aldeído oxidase ou em um polipeptídio que tem uma atividade de aldeído oxidase; e (b) transformar a dita célula hospedeira com um polinucleotídeo que codifica um polipeptídio de uma via biossintética de isobutanol.

[0240] Nas realizações, são fornecidos os métodos para reduzir ou eliminar a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico que compreendem (a) fornecer uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento; e (b) cultivar a dita célula hospedeira sob condições em que a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico é reduzida ou eliminada em comparação a uma célula hospedeira recombinante que não compreende uma atividade de aldeído desidrogenase e/ou de aldeído oxidase reduzida ou eliminada. A conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico de uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode ser medida através de métodos conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, *Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pg. 201 a 202) e/ou descritos no presente documento.

#### **REDUÇÃO DE DHMB**

[0241] A produção de DHMB em uma célula hospedeira que compreende uma via biossintética de isobutanol indica que nem todos os substratos de via são convertidos para o produto desejado. Desse modo, o rendimento é diminuído. Além disso, o DHMB pode ter efeitos inibitórios em uma produção de produto. Por exemplo, o DHMB pode diminuir a atividade de enzimas na via biossintética ou ter outros efeitos inibitórios em crescimento de levedura e/ou em produtividade durante uma fermentação. Desse modo, os métodos descritos no presente documento fornecem modos de reduzir o DHMB durante uma fermentação. Os métodos incluem tanto os métodos para diminuir a produção de DHMB quanto os métodos para remover o DHMB de composições de fermentação.

**DIMINUIR UMA PRODUÇÃO DE DHMB**

[0242] Em algumas realizações descritas no presente documento, uma célula hospedeira recombinante pode compreender uma habilidade reduzida ou eliminada de converter acetolactato em DHMB. A habilidade de uma célula hospedeira para converter acetolactato em DHMB pode ser reduzida ou eliminada, por exemplo, através de uma modificação ou perturbação de um polinucleotídeo ou gene que codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de acetolactato redutase ou uma modificação ou perturbação de um polipeptídeo que tem uma atividade de acetolactato redutase. Em outras realizações, a célula hospedeira recombinante pode compreender uma deleção, uma mutação e/ou uma substituição em um gene ou polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de acetolactato redutase ou em um polipeptídeo endógeno que tem acetolactato redutase. Tais modificações, perturbações, deleções, mutações e/ou substituições podem resultar em uma atividade de acetolactato redutase que é reduzida, substancialmente eliminada ou eliminada. Em algumas realizações da invenção, o produto da via biossintética é produzido em um rendimento ou uma quantidade maior em comparação com a produção do mesmo produto em uma célula hospedeira recombinante que não compreende uma habilidade reduzida ou eliminada de converter acetolactato em DHMB.

[0243] Desse modo, o produto pode ser uma composição que compreende butanol que é substancialmente livre ou livre de DHMB. Em algumas realizações, a composição que compreende butanol contém não mais do que cerca de 5 mM, cerca de 4 mM, cerca de 3 mM, cerca de 2 mM, cerca de 1 mM, cerca de 0,5 mM, cerca de 0,4 mM, cerca de 0,3 mM de DHMB ou cerca de 0,2 mM de DHMB.

[0244] O produto pode também ser uma composição que compreende 2,3-butanodiol (BDO) que é substancialmente livre ou livre de DHMB. Em algumas realizações, a composição que compreende BDO contém não mais do que cerca de 5 mM, cerca de 4 mM, cerca de 3 mM, cerca de 2 mM, cerca de 1 mM, cerca de 0,5 mM, cerca de 0,4 mM, cerca de 0,3 mM de DHMB ou cerca de 0,2 mM de DHMB.

[0245] Qualquer produto de uma via biossintética que envolve a conversão de acetolactato em um substrato que não seja DHMB pode ser produzido com maior eficácia em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento que tem a modificação descrita de uma atividade de acetolactato redutase. Tais produtos incluem, mas não são limitados a, butanol, por exemplo, isobutanol, 2-butanol e BDO, e aminoácidos de cadeia ramificada.

[0246] Em algumas realizações, a célula hospedeira compreende pelo menos uma deleção, mutação e/ou substituição em pelo menos um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de acetolactato redutase. Em algumas realizações, a célula hospedeira compreende pelo menos uma deleção, mutação e/ou substituição em cada um dentre os pelo menos dois polinucleotídeos endógenos que codificam os polipeptídios que têm uma atividade de acetolactato redutase.

[0247] Em algumas realizações, um polipeptídeo que tem uma atividade de acetolactato redutase pode catalisar a conversão de acetolactato em DHMB. Em algumas realizações, um polipeptídeo que tem uma atividade de acetolactato redutase é capaz de catalisar a redução de acetolactato em 2S.3S-DHMB (DHMB rápido) e/ou 2S.3R-DHMB (DHMB lento).

#### **TABELA 6**

[0248] Polipeptídios e polinucleotídeos que têm uma atividade de acetolactato redutase em *Saccharomyces cerevisiae*

Gene	SEQ ID NO: (ácido nucleico, aminoácido)
YMR226C	676, 677
YIL074C (Cr 9)	678, 679
YIR036C (Cr 9)	680, 681
YPL061W (ALD6) (Cr 16)	682, 683
YPL088W (Cr 16)	684, 685
YCR105W (ADH7) (Cr 3)	686, 687
YDR541C (Cr 4)	688, 689
YER081 (SER3) (Cr 5)	690, 691
YPL275W (FDH2) (Cr 16)	692, 693
YBR006W (UGA5) (Cr 2)	694, 695
YOL059W (Cr 15)	696, 697
YER081W (Cr 5)	869, 870
YOR375C (Cr 15)	871, 872

[0249]Em algumas realizações, a conversão de acetolactato em DHMB em uma célula hospedeira recombinante é reduzida, substancialmente eliminada ou eliminada. Em algumas realizações, o polipeptídio que tem uma atividade de acetolactato redutase é selecionado dentre o grupo que consiste em: YMR226C, YER081W, YIL074C, YBR006W, YPL275W, YOL059W, YIR036C, YPL061W, YPL088W, YCR105W, YOR375C e YDR541C. Em algumas realizações, o polipeptídio que tem uma atividade de acetolactato redutase é um polipeptídio que compreende uma sequência listada na tabela 6 ou uma sequência que é pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99% idêntica a uma sequência de polipeptídio listada na tabela 6. Em algumas realizações, o polipeptídio que tem uma atividade de acetolactato redutase é um polipeptídio codificado por uma sequência de polinucleotídeo listada na tabela 6 ou uma sequência que é pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99% idêntica a uma sequência de polinucleotídeo listada na tabela 6.

**TABELA 7: EXEMPLOS DE HOMÓLOGOS DE LEVEDURA YMR226C**

Espécies	Nº de acesso	SEQ ID NO: (ácido nucleico, aminoácido)
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	AABY01000127	698, 699
<i>Saccharomyces bayanus</i>	AACA01000631	700, 701 MSQGRKAAERLANKTVLITGASAGIGKA TALEYLEASNGNMKLILAARRLEKLEELK KTIDEEFPNAKVHVGQLDITQAEKIKPFI ENLPEAFKDIDILINNAGKALGSEVGEI ATQDIQDVFDNTVTALINVTQAVLPIFQA KNSGDIVNLGLGGRQRRIPHLHLLCFQ VCRRCVH*QFEKGTQEDQSYLDRAGA G*DRVLTGQIQR**GTS*KRLQGHYAVD GRRRG*LNRIHFQKAEHRGCRHPDLP HQPSLALPHLSRL* (SEQ ID NO:701) A sequência veio de um estudo de genômicos comparativo com o uso de sequências de genoma de tiragem com cobertura de 7 vezes (kellis et al., Nature 423:241 a 254 (2003)).
<i>Saccharomyces castellii</i>	AACF01000116	702, 703
<i>Saccharomyces mikatae</i>	AACH01000019	704, 705
<i>Ashybya gossypii</i>	AE016819	706, 707
<i>Candida glabrata</i>	CR380959	708, 709
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CR382139	710, 711
<i>Scheffersomyces stipitis</i> (antigo <i>Pichia stipitis</i> )	XM_001387479	712, 713
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (antigo <i>Pichia guilliermondii</i> )	XM_001482184	714, 715
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> (antigo <i>Kluyveromyces polysporus</i> )	XM_001645671	716, 717
<i>Candida dubliniensis</i>	XM_002419771	718, 719
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	XM_002494574	720, 721
<i>Lachancea thermotolerans</i> (antigo <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> )	XM_002553230	722, 723
<i>Kluyveromyces kluyveri</i>	XM_451902	724, 725
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	SAKL0H04730	726, 727
<i>Yarrowia lipolytica</i>	XM_501554	728, 729
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NM_001018495	730, 731

[0250] Em algumas realizações, um polipeptídio que tem uma atividade de acetolactato redutase é YMR226C ou um homólogo de YMR226C. Desse modo, em algumas realizações, o polipeptídio que tem uma atividade de acetolactato redutase é um polipeptídio que compreende uma sequência listada na tabela 7 ou uma sequência que é pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99% idêntica a uma sequência de polipeptídio listada na tabela 7. Em algumas realizações, o polipeptídio que tem uma atividade de acetolactato redutase é

um polipeptídeo codificado por uma sequência de polinucleotídeo listada na tabela 7 ou uma sequência que é pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99% idêntica a uma sequência de polinucleotídeo listada na tabela 7. Os acetolactato redutases capazes de converter acetolactato em DHMB podem ser identificados, por exemplo, colocando em triagem uma levedura genericamente alterada para alterações em consumo de acetolactato, alterações em produção de DHMB, alterações em produção de DHIV ou alterações em produção de outro produto a jusante (por exemplo, butanol).

[0251] Uma maneira de identificar um gene envolvido em uma produção de DHMB compreende medir a quantidade de DHMB produzido por cepas de levedura individuais em uma biblioteca de nocaute de levedura. As bibliotecas de nocaute são disponíveis, por exemplo, por Open Biosystems® (uma divisão da Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Nesse método, uma diminuição em produção de DHMB indica que o gene que foi nocauteado funciona para aumentar uma produção de DHMB e um aumento em produção de DHMB indica que o gene que foi nocauteado funciona para diminuir uma produção de DHMB.

[0252] Duas maneiras que uma biblioteca de nocaute (KO) pode ser usada para identificar genes candidatos para um envolvimento na síntese de DHMB incluem: (1) DHMB e DHIV acumulados na cultura durante um crescimento de substratos endógenos (acetolactato e NADPH ou NADH) podem ser analisados em amostras de culturas. Essas amostras podem ser colocadas em um banho de água quente (80 a 100 °C) por 10 a 20 min ou diluídas em uma solução tal como 2% de ácido fórmico que irá exterminar e permeabilizar as células. Após cada tratamento, pequenas moléculas serão encontradas no sobrenadante após uma centrifugação (5 min, 1.100 x g). A



relação DHMB/DHIV de uma cepa de controle (por exemplo, BY4743) pode ser comparada a mesma dos diferentes derivados de KO, e o(s) gene(s) que faltam de qualquer(s) cepa(s) com relações DHMB/DHIV excepcionalmente baixas pode codificar o acetolactato redutase (ALR). (2) As taxas de formação de DHMB e/ou de DHIV in vitro de substratos exógenos (acetolactato e NADH e/ou NADPH) podem ser medidas em amostras temporizadas tomadas de uma suspensão de células permeabilizadas e inativadas em cada uma das maneiras descritas acima. Visto que os substratos para as sínteses de DHMB e DHIV são os mesmos, isso permite que uma pessoa meça os níveis relativos de ALR e uma atividade de KARI na amostra.

[0253] Outra maneira de identificar um gene envolvido em uma produção de DHMB compreende medir a quantidade de DHMB produzido por cepas de levedura individuais em uma biblioteca de superexpressão de levedura. As bibliotecas de superexpressão são disponíveis, por exemplo, por Open Biosystems® (uma divisão da Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Nesse método, uma diminuição em produção de DHMB indica que o gene superexpresso funciona para diminuir uma produção de DHMB e um aumento em produção de DHMB indica que o gene superexpresso funciona para aumentar uma produção de DHMB.

[0254] Outra maneira de identificar um gene envolvido em uma produção de DHMB é analisar de modo bioquímico uma cepa de levedura que produz DHMB. Por exemplo, As células que produzem DHMB podem ser perturbadas. Essa perturbação pode ser realizada em pH baixo e temperaturas frias. Os lisatos de célula podem ser separados em frações, por exemplo, adicionando-se sulfato de amônio ou outras técnicas conhecidas por aqueles de habilidade na técnica e as frações resultantes podem ser avaliadas por atividade enzimática. Por exemplo, as frações podem ser avaliadas pela habilidade de converter acetolactato em DHMB. As frações com atividade

enzimática podem ser tratadas através de métodos conhecidos na técnica para purificar e concentrar a enzima (por exemplo, diálise e separação cromatográfica). Quando uma pureza e uma concentração suficientes são alcançadas, a enzima pode ser sequenciada e o gene correspondente que codifica o acetolactato redutase capaz de converter acetolactato em DHMB pode ser identificado.

[0255] Além do mais, visto que a redução de acetolactato em DHMB ocorre em levedura, mas não ocorre na mesma extensão em *E. coli*, as acetolactato redutases que são expressas em levedura, mas não expressas em *E. coli*, podem ser selecionadas para triagem. As enzimas selecionadas pode ser expressas em levedura ou em outros sistemas de expressão de proteína e submetidas a triagem pela capacidade de converter acetolactato em DHMB.

[0256] As enzimas capazes de catalisar a conversão de acetolactato em DHMB podem ser submetidas a triagem ensaiando-se por níveis de acetolactato, ensaiando-se por níveis de DHMB, ensaiando-se por níveis de DHIV ou ensaiando-se por qualquer um dentre os produtos a jusante na conversão de DHIV em butanol, inclusive isobutanol.

[0257] O DHMB pode ser medido com o uso de qualquer técnica conhecida por aqueles de habilidade na técnica. Por exemplo, o DHMB pode ser separado e quantificado através de métodos conhecidos por aqueles de habilidade na técnica e de técnicas descritas nos exemplos fornecidos no presente documento. Por exemplo, o DHMB pode ser separado e quantificado com o uso de cromatografia líquida-espectometria de massa, cromatografia líquida-ressonância magnética nuclear (NMR), cromatografia de camada fina e/ou HPLC com detecção de UV Vis.

[0258] Nas realizações, os polinucleotídeos, os genes e/ou os polipeptídios de acetolactato redutase selecionados revelados no presente documento podem ser modificados ou perturbados. Muitos métodos adequados

são conhecidos por aqueles de habilidade comum na técnica e incluem aqueles descritos para aldeído desidrogenase (acima).

[0259] A modificação de acetolactato redutase em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento para reduzir ou eliminar uma atividade de acetolactato redutase pode ser confirmada com o uso dos métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a presença ou a ausência de uma sequência de polinucleotídeo que codifica acetolactato redutase pode ser determinada com o uso de triagem de PCR. Uma diminuição em uma atividade de acetolactato redutase pode também ser determinada com base em uma redução de conversão de acetolactato em DHMB. Uma diminuição em uma atividade de acetolactato redutase pode também ser determinada com base em uma redução de produção de DHMB. Uma diminuição em uma atividade de acetolactato redutase pode também ser determinada com base em um aumento de produção de butanol.

[0260] Desse modo, em algumas realizações, uma levedura que é capaz de produzir butanol produz não mais do que cerca de 5 mM, cerca de 4 mM, cerca de 3 mM, cerca de 2 mM, cerca de 1 mM, cerca de 0,9 mM, cerca de 0,8 mM, cerca de 0,7 mM, cerca de 0,6 mM, cerca de 0,5 mM, cerca de 0,4 mM ou cerca de 0,3 mM de DHMB. Em algumas realizações, uma levedura que produz butanol produz não mais do que cerca 5 mM, cerca de 4 mM, cerca de 3 mM, cerca de 2 mM, cerca de 1 mM, cerca de 0,9 mM, cerca de 0,8 mM, cerca de 0,7 mM, cerca de 0,6 mM, cerca de 0,5 mM, cerca de 0,4 mM ou cerca de 0,3 mM de DHMB. Em algumas realizações, uma levedura que produz butanol produz não mais do que cerca de 0,2 mM ou 0,2 mM de DHMB.

[0261] Em algumas realizações, uma levedura capaz de produzir butanol produz não mais do que cerca 10 mM de DHMB quando colocado em cultura sob condições de fermentação por pelo menos cerca de 50 horas. Em algumas realizações, uma levedura capaz de produzir butanol produz não mais

do que cerca 5 mM de DHMB quando colocado em cultura sob condições de fermentação por pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 25 horas, pelo menos cerca de 30 horas, pelo menos cerca de 35 horas, pelo menos cerca de 40 horas, pelo menos cerca de 45 horas, ou pelo menos cerca de 50 horas. Em algumas realizações, uma levedura capaz de produzir butanol produziu não mais do que cerca de 3 mM de DHMB quando colocado em cultura sob condições de fermentação por pelo menos cerca de 5 horas, pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 15 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 25 horas, pelo menos cerca de 30 horas, pelo menos cerca de 35 horas, pelo menos cerca de 40 horas, pelo menos cerca de 45 horas ou pelo menos cerca de 50 horas. Em algumas realizações, uma levedura capaz de produzir butanol produziu não mais do que cerca de 1 mM de DHMB quando colocado em cultura sob condições de fermentação por pelo menos cerca de 1 hora, pelo menos cerca de 5 horas, pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 15 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 25 horas, pelo menos cerca de 30 horas, pelo menos cerca de 35 horas, pelo menos cerca de 40 horas, pelo menos cerca de 45 horas ou pelo menos cerca de 50 horas. Em algumas realizações, uma levedura capaz de produzir butanol produziu não mais do que cerca de 0,5 mM de DHMB quando colocado em cultura sob condições de fermentação por pelo menos cerca de 1 hora, pelo menos cerca de 5 horas, pelo menos cerca de 10 horas, pelo menos cerca de 15 horas, pelo menos cerca de 20 horas, pelo menos cerca de 25 horas, pelo menos cerca de 30 horas, pelo menos cerca de 35 horas, pelo menos cerca de 40 horas, pelo menos cerca de 45 horas ou pelo menos cerca de 50 horas.

[0262] Em algumas realizações, uma levedura que compreende pelo menos uma deleção, uma mutação e/ou uma substituição em um polinucleotídeo endógeno que codifica um acetolactato redutase produz não

mais do que cerca de 0,5 vez, cerca de 0,4 vez, cerca de 0,3 vez, cerca de 0,2 vez, cerca de 0,1 vez ou cerca de 0,05 vez a quantidade de DHMB produzido por uma levedura que contém o polinucleotídeo endógeno que codifica um acetolactato redutase quando colocado em cultura sob condições de fermentação pela mesma quantidade de tempo.

[0263] Em algumas realizações, uma levedura que tem capacidade para produzir butanol produz uma quantidade de DHIV que é pelo menos aproximadamente 5 mM, pelo menos aproximadamente 6 mM, pelo menos aproximadamente 7 mM, pelo menos aproximadamente 8 mM, pelo menos aproximadamente 9 mM ou pelo menos aproximadamente 10 mM.

[0264] Em algumas realizações, uma levedura que tem capacidade para produzir butanol produz uma quantidade de DHIV que é pelo menos cerca da quantidade de DHMB produzido. Em algumas realizações, uma levedura que tem capacidade para produzir butanol produz uma quantidade de DHIV que é pelo menos aproximadamente duas vezes, aproximadamente três vezes, aproximadamente cinco vezes, aproximadamente dez vezes, aproximadamente 15 vezes, aproximadamente 20 vezes, aproximadamente 25 vezes, aproximadamente 30 vezes, aproximadamente 35 vezes, aproximadamente 40 vezes, aproximadamente 45 vezes ou aproximadamente 50 vezes a quantidade de DHMB produzido. Em algumas realizações, uma levedura que tem capacidade para produzir butanol produz DHIV em uma taxa que é pelo menos aproximadamente igual à taxa de produção de DHMB. Em algumas realizações, uma levedura que tem capacidade para produzir butanol produz DHIV em uma taxa que é pelo menos aproximadamente duas vezes, aproximadamente três vezes, aproximadamente cinco vezes, aproximadamente dez vezes, aproximadamente 15 vezes, aproximadamente 20 vezes, aproximadamente 25 vezes, aproximadamente 30 vezes, aproximadamente 35 vezes, aproximadamente 40 vezes,

aproximadamente 45 vezes ou aproximadamente 50 vezes a taxa de produção de DHMB.

[0265] Em algumas realizações, uma levedura que tem capacidade para produzir butanol produz menos do que 0,010 mole de DHMB por mole de glicose consumida. Em algumas realizações, uma levedura produz menos do que aproximadamente 0,009, menos do que aproximadamente 0,008, menos do que aproximadamente 0,007, menos do que aproximadamente 0,006 ou menos do que aproximadamente 0,005 mole de DHMB por mole de glicose consumida. Em algumas realizações, uma levedura produz menos do que aproximadamente 0,004, menos do que aproximadamente 0,003, menos do que aproximadamente 0,002 ou menos do que aproximadamente 0,001 mole de DHMB por mole de glicose consumida.

[0266] Em algumas realizações, atividade de acetolactato redutase é inibida através de meios químicos. Por exemplo, o acetolactato redutase pode ser inibido com o uso de outros substratos conhecidos tal como aqueles listados em Fujisawa *et al.* que incluem L-serina, D-serina, 2-metil-DL-serina, D-treonina, L-allo-treonina, L-3-hidroxi-isobutirato, D-3-hidroxi-isobutirato, 3- hidroxipropionato, L-3-hidroxibutirato e D-3-hidroxibutirato. Biochimica et Biophysica Acta 1645:89-94 (2003), que é incorporado no presente documento a título de referência integralmente.

#### **REMOÇÃO DE DHMB**

[0267] Em outras realizações descritas no presente documento, uma redução em DHMB pode ser alcançada removendo-se DHMB a partir de uma fermentação. Portanto, as fermentações com concentrações de DHMB reduzido também são descritas no presente documento. A remoção de DHMB pode resultar, por exemplo, em um produto de pureza maior ou um produto que exige menor processamento para alcançar uma pureza desejada. Por este

motivo, as composições que compreendem produtos de vias biossintéticas tais como etanol ou butanol com pureza aumentada também são fornecidas.

[0268] O DHMB pode ser removido durante ou após um processo de fermentação e pode ser removido através de qualquer meio conhecido na técnica. O DHMB pode ser removido, por exemplo, através da extração em uma extração reativa ou fase orgânica.

[0269] Em algumas realizações, o caldo de fermentação compreende menos do que aproximadamente DHMB 0,5 mM. Em algumas realizações, o caldo de fermentação compreende menos do que aproximadamente DHMB 1,0 mM após aproximadamente 5 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 45 horas ou aproximadamente 50 horas de fermentação. Em algumas realizações, o caldo de fermentação compreende menos do que aproximadamente DHMB 5,0 mM após aproximadamente 20 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 45 horas ou aproximadamente 50 horas de fermentação.

#### **TRAJETÓRIAS BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL**

[0270] Determinadas vias biossintéticas de isobutanol adequadas são reveladas nas Patentes U.S. 7.851.188 e 7.993.889, cada uma das quais está incorporada a título de referência no presente documento. Um diagrama das vias biossintéticas de isobutanol reveladas é fornecido na Figura 1. Conforme descrito na Patente nº U.S. 7.851.188, as etapas em uma via biossintética de isobutanol exemplificativa incluem a conversão de:

- piruvato para acetolactato (consulte a Figura 1, etapa de via a na mesma), conforme catalisado, por exemplo, através de acetolactato sintase

(ALS),

- acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato (consulte a Figura 1, etapa de via b na mesma), conforme catalisado, por exemplo, através de ácido acetohidróxi isomeroreductase (KARI);

- 2,3-diidroxiisovalerato para 2-cetoisovalerato (consulte a Figura 1, etapa de via c na mesma), conforme catalisado, por exemplo, através de ácido acetohidróxi desidratase, também chamada diidroxi-ácido desidratase (DHAD);

- 2-cetoisovalerato para isobutiraldeído (consulte a Figura 1, etapa de via d na mesma), conforme catalisado, por exemplo, através de 2-cetoácido de cadeia ramificada descarboxilase; e

- isobutiraldeído para isobutanol (consulte a Figura 1, etapa de via e na mesma), conforme catalisado, por exemplo, através de álcool de cadeia ramificada desidrogenase.

[0271] Em outra realização, a via biossintética de isobutanol compreende as conversões de substrato para produto a seguir:

- piruvato para acetolactato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetolactato sintase;

- acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de cetol-ácido redutoisomerase;

- 2,3-diidroxiisovalerato para  $\alpha$ -cetoisovalerato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de diidroxiácido desidratase;

- $\alpha$ -cetoisovalerato para valina, que pode ser catalisada, por exemplo, através de transaminase ou valina desidrogenase;

- valina para isobutilamina, que pode ser catalisada, por exemplo, através de valina descarboxilase;

- isobutilamina para isobutiraldeído, que pode ser catalisada através de, por exemplo, ômega transaminase; e,

- isobutiraldeído para isobutanol, que pode ser catalisada, por



exemplo, através de um álcool de cadeia ramificada desidrogenase.

[0272] Em outra realização, a via biossintética de isobutanol compreende as conversões de substrato para produto a seguir:

- piruvato para acetolactato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetolactato sintase;
- acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetohidróxi ácido reductoisomerase;
- 2,3-diidroxiisovalerato para  $\alpha$ -cetoisovalerato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de ácido acetohidróxi desidratase;
- $\alpha$ -cetoisovalerato para isobutiril-CoA, que pode ser catalisada, por exemplo, através de cetoácido de cadeia ramificada desidrogenase;
- isobutiril-CoA para isobutiraldeído, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetilação de aldeído desidrogenase; e,
- isobutiraldeído para isobutanol, que pode ser catalisada, por exemplo, através de um álcool de cadeia ramificada desidrogenase.

[0273] Em outra realização, a via biossintética de isobutanol compreende as conversões de substrato para produto mostradas como etapas k, g e na Figura 1.

[0274] Os genes e polipeptídeos que podem ser usados para as conversões de substrato para produto descritas acima assim como aquelas para vias de isobutanol adicionais, são descritos na Publicação de Pedido de Patente nº U.S. 2007/0092957 e Pedido PCT nº WO 2011/019894, ambos incorporados a título de referência no presente documento. As Publicações de Pedido U.S. nºs 2011/019894, 2007/0092957, 2010/0081154, que são incorporadas no presente documento a título de referência, descrevem diidroxiácido desidratases que incluem aqueles dentre *Lactococcus lactis* e *Streptococcus mutans*. As cetoisovalerato decarboxylases incluem aqueles derivados a partir de *Lactococcus lactis*, *Macroccoccus caseolyticus* (SEQ ID

NO: 542) e *Listeria grayi* (SEQ ID NO: 543). A Publicação de Pedido de Patente nº U.S. 2009/0269823 e a Publicação de Pedido U.S. nº 2011/0269199, incorporadas a título de referência, descrevem álcool desidrogenases, incluindo aquelas que utilizam NADH como um cofator. As álcool desidrogenases incluem SadB de *Achromobacter xylosoxidans*. As álcool desidrogenases adicionais incluem ADH de fígado de cavalo e ADH *Beijerinckia indica*. As álcool desidrogenases incluem aqueles que utilizam NADH como um cofator. Em uma realização, uma via biossintética de butanol compreende a) uma cetol-ácido redutoisomerase que tem um  $K_M$  para NADH inferior a aproximadamente 300  $\mu M$ , inferior a aproximadamente 100  $\mu M$ , inferior a aproximadamente 50  $\mu M$ , inferior a aproximadamente 20  $\mu M$  ou inferior a aproximadamente 10  $\mu M$ ; b) um álcool desidrogenase que utiliza NADH como um cofator; ou c) tanto a) quanto b).

[0275] O documento WO 2011/019894 e as Publicações de Pedido U.S. nºs 2011/019894, 2007/0092957, 2010/0081154, que estão integralmente incorporadas no presente documento a título de referência, descrevem diidroxíácido desidratases adequadas. Os métodos de aumento de atividade de DHAD são descritos, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente no U.S. 2010/0081173 e no Pedido de Patente nº U.S. 13/029.558, depositados em 17 de fevereiro de 2011, que estão incorporados integralmente no presente documento a título de referência.

[0276] As enzimas de cetol-ácido redutoisomerase (KARI) adequadas são descritas nas Publicações de Pedido de Patente no U.S. 2008/0261230 A1, 2009/0163376, 2010/0197519, 2010/0143997 e 2011/0244536, que estão integralmente incorporadas no presente documento a título de referência. Os exemplos de KARIs reveladas nos mesmos são aqueles de *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 e *Pseudomonas fluorescens* PF5. Em algumas realizações, a enzima KARI tem uma atividade específica de pelo menos

aproximadamente 0,1 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 0,2 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 0,3 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 0,4 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 0,5 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 0,6 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 0,7 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 0,8 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 0,9 micromole/min/mg, pelo menos aproximadamente 1,0 micromole/min/mg ou pelo menos aproximadamente 1,1 micromole/min/mg. Os polipeptídeos adequados para catalisar a conversão de substrato para produto acetolactato para 2,3-diidroxiisovalerato incluem aqueles que têm um  $K_M$  para NADH inferior a aproximadamente 300  $\mu\text{M}$ , inferior a aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , inferior a aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , inferior a aproximadamente 25  $\mu\text{M}$  ou inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ .

[0277] Em algumas realizações, a KARI utiliza NADPH. Os métodos de edição de consumo de NADPH são conhecidos na técnica. Por exemplo, o Pedido Publicado nº U.S. 2008/0261230, que está incorporado integralmente no presente documento a título de referência, fornece métodos de medição de consumo de NADPH. Em algumas realizações, um ensaio de consumo de NADPH é um método que mede o desaparecimento do cofator, NADPH, durante a conversão enzimática de acetolactato para  $\alpha$ - $\beta$ -diidroxiisovalerato em 340 nm. A atividade é calculada com o uso do coeficiente de extinção molar de  $6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para NADPH e é reportada como  $\mu\text{mole}$  de NADPH consumido por minuto por mg de proteína total em extratos de célula (consulte Aulabaugh and Schloss, Biochemistry 29: 2824 a 2830, 1990).

[0278] Em algumas realizações, a KARI tem capacidade para utilizar NADH. Em algumas realizações, a KARI tem capacidade para utilizar NADH sob condições anaeróbicas. As enzimas KARI que usam NADH são descritas, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente no U.S.

2009/0163376, que está incorporada no presente documento a título de referência integralmente.

[0279] Os genes adicionais que podem ser usados podem ser identificados por um indivíduo versado na técnica através de bioinformática ou com o uso de métodos bem conhecidos na técnica.

[0280] A construção de genes quiméricos e engenharia genética de bactérias e levedura para produção de isobutanol com o uso das vias biossintéticas reveladas estão descritas adicionalmente na Publicação de Pedido de Patente nº U.S. US 2007/0092957 A1, que está incorporada a título de referência no presente documento.

[0281] As vias biossintéticas para a produção de 1-butanol que pode ser usado incluem aquelas descritas na Publicação de Pedido nº U.S. 2008/0182308, que está incorporada no presente documento a título de referência. Em uma realização, a via biossintética de 1-butanol compreende as conversões de substrato para produto a seguir:

- a) acetil-CoA para acetoacetil-CoA, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetil-CoA acetil transferase;
- b) acetoacetil-CoA para 3-hidroxi butiril-CoA, que pode ser catalisada, por exemplo, através de 3-hidroxi butiril-CoA desidrogenase;
- c) 3-hidroxi butiril-CoA para crotonil-CoA, que pode ser catalisada, por exemplo, através de crotonase;
- d) crotonil-CoA para butiril-CoA, que pode ser catalisada, por exemplo, através de butiril-CoA desidrogenase;
- e) butiril-CoA para butiraldeído, que pode ser catalisada, por exemplo, através de butiraldeído desidrogenase; e,
- f) butiraldeído para 1-butanol, que pode ser catalisada, por exemplo, através de butanol desidrogenase.

[0282] As vias biossintéticas para a produção de 2-butanol que podem ser usadas incluem aquelas descritas na Publicação de Pedido nº U.S. 2007/0259410 e na Publicação de Pedido nº U.S. 2009/0155870, que estão incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma realização, a via biossintética de 2-butanol compreende as conversões de substrato para produto a seguir:

- a) piruvato para alfa-acetolactato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetolactato sintase;
- b) alfa-acetolactato para acetoína, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetolactato descarboxilase;
- c) acetoína para 3-amino-2-butanol, que pode ser catalisada, por exemplo, acetoina aminase;
- d) 3-amino-2-butanol para 3-amino-2-butanol fosfato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de aminobutanol cinase;
- e) 3-amino-2-butanol fosfato para 2-butanona, que pode ser catalisada, por exemplo, através de aminobutanol fosfato fosforilase; e,
- f) 2-butanona para 2-butanol, que pode ser catalisada, por exemplo, através de butanol desidrogenase.

[0283] Em outra realização, a via biossintética de 2-butanol compreende as conversões de substrato para produto a seguir:

- a) piruvato para alfa-acetolactato, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetolactato sintase;
- b) alfa-acetolactato para acetoína, que pode ser catalisada, por exemplo, através de acetolactato descarboxilase;
- c) acetoína para 2,3-butanediol, que pode ser catalisada, por exemplo, através de butanediol desidrogenase;
- d) 2,3-butanediol para 2-butanona, que pode ser catalisada, por exemplo, através de dial desidratase; e,

- e) 2-butanona para 2-butanol, que pode ser catalisada, por exemplo, através de butanol desidrogenase.

[0284] Em algumas realizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante compreende uma via biossintética. A via biossintética pode compreender atividade de aldeído desidrogenase reduzida ou eliminada e uma via biossintética de isobutanol ou 1-butanol em que a via compreende a conversão de substrato para produto piruvato para acetolactato. Em algumas realizações, uma célula hospedeira que compreende uma via biossintética que tem capacidade para converter piruvato para acetolactato compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de acetolactato sintase. Por exemplo, a via biossintética pode ser uma via de produção de butanol ou uma via de produção de butanediol. A via biossintética também pode ser uma via de produção de aminoácido de cadeia ramificada (por exemplo, leucina, isoleucina, valina).

[0285] Em outras realizações, a célula hospedeira recombinante pode compreender um isobutanol, 1-butanol ou uma via biossintética de 2-butanol conforme descrito no presente documento. Em algumas realizações, a via biossintética de butanol é uma via biossintética de isobutanol. A produção de isobutanol ou 2-butanol em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode se beneficiar de uma redução, eliminação substancial ou eliminação de uma atividade de acetolactato redutase.

### **MODIFICAÇÕES**

[0286] A deleção funcional do gene de piruvato descarboxilase tem sido usada para aumentar a disponibilidade de piruvato para a utilização em vias de produto biossintéticas. Por exemplo, a Publicação de Pedido U.S. nº 2007/0031950 A1, que está incorporada integralmente no presente documento a título de referência, revela uma cepa de levedura com uma interrupção de um ou mais genes de piruvato descarboxilase e expressão de

um gene de D-lactato desidrogenase, que é usado para a produção de D-ácido láctico. A Publicação de Pedido U.S. nº 2005/0059136 A1, que está incorporada integralmente no presente documento a título de referência, revela duas cepas de levedura independentes de fonte de carbono tolerantes à glicose (GCSI) sem atividade de piruvato descarboxilase, que pode ter um gene de lactato desidrogenase exógeno. Nevoigt e Stahl (*Yeast* 12: 1331 a 1337 (1996)) descrevem o impacto de piruvato descarboxilase reduzido e glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD aumentado em *Saccharomyces cerevisiae* no rendimento de glicerol. A Publicação de Pedido nº U.S. 2009/0305363, que está incorporada integralmente no presente documento a título de referência, revela conversão aumentada de piruvato para acetolactato através de engenharia de levedura para expressão de um acetolactato sintase de citosol localizado e eliminação substancial de atividade de piruvato descarboxilase.

[0287] Nas realizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode compreender uma modificação em um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem atividade de piruvato descarboxilase (PDC) ou uma modificação em um polipeptídeo endógeno que tem atividade de PDC. Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode ter uma modificação ou interrupção de um polinucleotídeo, gene e/ou polipeptídeo que codifica PDC. Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante compreende uma deleção, mutação e/ou substituição em um gene ou polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem atividade de PDC, ou em polipeptídeos endógenos que têm atividade de PDC. Tais modificações, interrupções, deleções, mutações e/ou substituições podem resultar em atividade de PDC que é reduzida ou eliminada, resultando, por exemplo, em um fenótipo de nocaute de PDC (PDC-KO).

[0288] Nas realizações da invenção, uma atividade de piruvato descarboxilase endógena de uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento converte piruvato para acetaldeído, que pode em seguida ser convertido para etanol ou para acetil-CoA por meio de acetato. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante é *Kluyveromyces lactis* contendo um gene que codifica piruvato descarboxilase, *Candida glabrata* contendo um gene que codifica piruvato descarboxilase ou *Schizosaccharomyces pombe* contendo um gene que codifica piruvato descarboxilase.

[0289] Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante é *Saccharomyces cerevisiae* contendo três isozimas de piruvato descarboxilase codificadas pelos genes PDC1, PDC5 e PDC6, assim como um gene regulador de piruvato descarboxilase, PDC2. Em um exemplo não limitante em *S. cerevisiae*, os genes PDC1 e PDC5 ou os genes PDC1, PDC5 e PDC6, são interrompidos. Em outro exemplo não limitante em *S. cerevisiae*, a atividade de piruvato descarboxilase pode ser reduzida interrompendo-se o gene regulador PDC2. Em outro exemplo não limitante em *S. cerevisiae*, os polinucleotídeos ou genes que codificam as proteínas de piruvato descarboxilase tais como aqueles que têm 70% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% ou aproximadamente 99% de identidade de sequência com PDC1, PDC2, PDC5 e/ou PDC6 podem ser interrompidos.

[0290] Nas realizações, um polipeptídeo que tem atividade de PDC ou um polinucleotídeo ou gene que codifica um polipeptídeo que tem atividade de PDC corresponde ao Número de Comissão de Enzima EC 4.1.1.1.



Em outras realizações, um gene de PDC de uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento não está ativo sob as condições de fermentação usadas e, portanto, tal gene pode não precisar ser modificado ou inativado.

[0291] Os exemplos de células hospedeiras recombinantes com atividade de piruvato descarboxilase reduzida devido à interrupção de piruvato descarboxilase que codifica genes ter sido reportada, tal como para *Saccharomyces* em Flikweert *et al.* (*Yeast* (1996) 12:247 a 257), para *Kluyveromyces* em Bianchi *et al.* (*Mol. Microbiol.* (1996). 19(1):27 a 36), e interrupção do gene regulador em Hohmann (*Mol. Gen. Genet.* (1993) 241 :657 a 666). As cepas de *Saccharomyces* que não tem atividade de piruvato descarboxilase estão disponíveis a partir da ATCC com nº de Acesso 200027 e 200028. Os exemplos de PDC polinucleotídeos, genes e/ou polipeptídeos que podem ser direcionados para a modificação ou inativação nas células hospedeiras recombinantes reveladas no presente documento incluem, mas sem limitação, aqueles da Tabela 8 a seguir.

**TABELA 8. PROTEÍNAS E REGIÕES DE CODIFICAÇÃO DE GENE ALVO DE PIRUVATO**

<b><u>DESCARBOXILASE</u></b>		
Descrição	SEQ ID NO: Ácido nucleico	SEQ ID NO: Aminoácido
PDC1 piruvato descarboxilase a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	648	649
PDC5 piruvato descarboxilase a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	650	651
PDC6 piruvato descarboxilase a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	652	653
piruvato descarboxilase a partir de <i>Candida glabrata</i>	654	655
PDC1 piruvato descarboxilase a partir de <i>Pichia stipitis</i>	656	657
PDC2 piruvato descarboxilase a partir de <i>Pichia stipitis</i>	658	659
piruvato descarboxilase a partir de <i>Kluyveromyces lactis</i>	660	661
piruvato descarboxilase a partir de <i>Yarrowia lipolytica</i>	662	663
piruvato descarboxilase a partir de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	664	665
piruvato descarboxilase a partir de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	666	667

[0292] Outros exemplos de polipeptídeos, genes e polinucleotídeos de PDC que podem ser direcionados para a modificação ou

inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas sem limitação, PDC polinucleotídeos, genes e/ou polipeptídeos que têm pelo menos aproximadamente 70% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% ou aproximadamente 99% de identidade de sequência com qualquer uma das sequências da Tabela 8, em que tal polinucleotídeo ou gene codifica, ou tal polipeptídeo tem, atividade de PDC. Ainda outros exemplos de polipeptídeos, genes e polinucleotídeos de PDC que podem ser direcionados para a modificação ou inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas sem limitação, um derivado, um fragmento ou uma variante ativa de qualquer uma das sequências da Tabela 8, em que tal polinucleotídeo ou gene codifica, ou tal polipeptídeo tem, atividade de PDC.

[0293] Nas realizações, um polinucleotídeo, um gene e/ou um polipeptídeo que codificam uma sequência de PDC revelados no presente documento ou conhecidos na técnica podem ser modificados, conforme revelado acima para aldeído desidrogenase. Em outras realizações, um polinucleotídeo, um gene e/ou um polipeptídeo que codificam PDC podem ser usados para identificar outra sequência de polinucleotídeo, gene e/ou polipeptídeo de PDC ou para identificar um homólogo de PDC em outras células, conforme revelado acima para acetolactato desidrogenase. Tal sequência de codificação de PDC pode ser identificada, por exemplo, na literatura e/ou em bancos de dados de bioinformática bem conhecidos ao indivíduo versado na técnica. Por exemplo, a identificação de uma sequência de codificação de PDC em outros tipos de células com o uso de bioinformática pode ser obtida através de pesquisa do tipo BLAST (conforme descrito acima)

de bancos de dados disponíveis publicamente com uma sequência de polipeptídeo e DNA de codificação de PDC, tal como aquela fornecida no presente documento. As identidades são baseadas no método Clustal W de alinhamento com o uso dos parâmetros predeterminados de GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1, e séries de Gonnet 250 de matriz de peso de proteína.

[0294] A modificação de PDC em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento para reduzir ou eliminar a atividade de PDC pode ser confirmada com o uso de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a interrupção de um piruvato descarboxilase particular pode ser confirmada com triagem de PCR com o uso de Iniciadores externos à sequência de gene, ou através de Southern blot com o uso de uma sonda projetada para a sequência de gene de piruvato descarboxilase. Alternativamente, um indivíduo pode utilizar métodos analíticos tal como cromatografia gasosa ou HPLC para triagem de cepas para produção diminuída ou eliminada de acetaldeído e/ou etanol.

[0295] A deleção funcional do gene de hexoquinase 2 tem sido usada para reduzir repressão de glicose e para aumentar a disponibilidade de piruvato para utilização em vias biossintéticas. Por exemplo, Publicação Internacional nº WO 2000/061722 A1, que está incorporada integralmente no presente documento a título de referência revela a produção de biomassa de levedura através de cultivo de modo aeróbico de levedura que tem um ou mais análogos ou genes de hexoquinase 2 funcionalmente deletados. Além disso, Rossell *et al.* (Yeast Research 8:155 a 164 (2008)) observou que *Saccharomyces cerevisiae* com uma deleção do gene de hexoquinase 2 mostrou 75% de redução em capacidade fermentativa, definida como a taxa específica de produção de dióxido de carbono sob condições anaeróbicas e de excesso de açúcar. Após a inanição, a capacidade de fermentação foi similar

àquela de uma cepa sem a deleção de gene de hexoquinase 2. Diderich et al. (Applied and Environmental Microbiology 67:1587 a 1593 (2001)) observou que *S. cerevisiae* com uma deleção do gene de hexoquinase 2 teve atividade de piruvato descarboxilase mais baixa.

[0296] Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode compreender uma modificação em um polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem atividade de hexoquinase 2 e/ou uma modificação em um polipeptídeo que tem atividade de hexoquinase 2. Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento pode ter uma modificação ou interrupção de um polinucleotídeo, gene ou polipeptídeo que codifica hexoquinase 2. Nas realizações, uma célula hospedeira recombinante compreende uma deleção, uma mutação e/ou uma substituição em um gene ou polinucleotídeo endógeno que codifica um polipeptídeo que tem atividade de hexoquinase 2, ou um polipeptídeo endógeno que tem atividade de hexoquinase 2. Tais modificações, interrupções, deleções, mutações e/ou substituições podem resultar em atividade de hexoquinase 2 que é reduzida ou eliminada, resultando, por exemplo, em um fenótipo de nocaute de hexoquinase 2 (HXK2-KO). Nas realizações, a célula hospedeira compreende uma modificação conforme descrito nos Pedidos nºs de Série U.S. 201 1/0124060 A1 ou 2012/0015416 A1, que estão incorporados integralmente no presente documento a título de referência.

[0297] Nas realizações, um polipeptídeo que tem atividade de hexoquinase 2 pode catalisar a conversão de hexose para hexose-6-fosfato, e/ou pode catalisar a conversão de D-glicose para D-glicose 6-fosfato, D-frutose para D-frutose 6-fosfato, e/ou D-manose para D-manose 6-fosfato. Em outras realizações, um polinucleotídeo, um gene ou um polipeptídeo que tem

atividade de hexoquinase 2 pode corresponder ao Número de Comissão de Enzima EC 2.7.1.1.

[0298] Nas realizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante pode ser *S. cerevisiae* e um polinucleotídeo, um gene ou um polipeptídeo que tem atividade de hexoquinase 2 pode ser HXK2. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *K. lactis* e um polinucleotídeo, um gene ou um polipeptídeo que tem atividade de hexoquinase 2 pode ser RAG5. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *H. polymorpha* e um polinucleotídeo, um gene ou um polipeptídeo que tem atividade de hexoquinase 2 pode ser HPGLK1. Em outras realizações, uma célula hospedeira recombinante pode ser *S. pombe* e um polinucleotídeo, um gene ou um polipeptídeo que tem atividade de hexoquinase 2 pode ser HXK2.

[0299] Os exemplos de polinucleotídeos, genes e polipeptídeos de hexoquinase 2 que podem ser direcionados para a modificação ou inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas sem limitação, aqueles da Tabela 9 a seguir.

**TABELA 9. PROTEÍNAS E REGIÕES DE CODIFICAÇÃO DE GENE ALVO DE HEXOQUINASE 2**

<i>HXK2</i> a partir de <i>S. cerevisiae</i>	<u>Ácido nucleico (SEQ ID NO: 668)</u>
	<u>Aminoácido (SEQ ID NO: 669)</u>
<i>RAG5</i> a partir de <i>K. lactis</i>	<u>Ácido nucleico (SEQ ID NO: 670):</u>
	<u>Aminoácido (SEQ ID NO: 671)</u>
<i>HPGLK1</i> a partir de <i>H. polymorpha</i>	<u>Ácido nucleico (SEQ ID NO: 672)</u>
	<u>Aminoácido (SEQ ID NO: 673)</u>
<i>HXK2</i> a partir de <i>S. pombe</i>	<u>Ácido nucleico (SEQ ID NO: 674)</u>
	<u>Aminoácido (SEQ ID NO: 675)</u>

[0300] Outros exemplos de polinucleotídeos, genes e polipeptídeos de hexoquinase 2 que podem ser direcionados para a modificação ou inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas sem limitação, os polinucleotídeos, genes e/ou polipeptídeos de hexoquinase 2 que tem pelo menos aproximadamente

70% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% ou aproximadamente 99% de identidade de sequência com qualquer uma das sequências da Tabela 9, em que tal polinucleotídeo ou gene codifica, ou tal polipeptídeo tem, atividade de hexoquinase 2. Ainda outros exemplos de polinucleotídeos, genes e polipeptídeos de hexoquinase 2 que podem ser direcionados para a modificação ou inativação em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento incluem, mas sem limitação, um derivado, um fragmento ou uma variante ativa de qualquer uma das sequências da Tabela 9, em que tal polinucleotídeo ou gene codifica, ou tal polipeptídeo tem, atividade de hexoquinase 2.

[0301] Nas realizações, um polinucleotídeo, um gene e/ou um polipeptídeo que codifica uma sequência de hexoquinase 2 revelada no presente documento ou conhecida na técnica pode ser modificado ou interrompido, conforme revelado acima para aldeído desidrogenase. Em outras realizações, um polinucleotídeo, um gene e/ou um polipeptídeo que encodifica hexoquinase 2 pode ser usado para identificar outra sequência de polinucleotídeo, gene e/ou polipeptídeo de hexoquinase 2 ou para identificar um homólogo de hexoquinase 2 em outras células, conforme revelado acima para aldeído desidrogenase. Tal sequência de codificação de hexoquinase 2 pode ser identificada, por exemplo, na literatura e/ou em bancos de dados de bioinformática bem conhecidos ao indivíduo versado na técnica. Por exemplo, a identificação de uma sequência de codificação de hexoquinase 2 em outros tipos de células com o uso de bioinformática pode ser obtida através de pesquisa do tipo BLAST (conforme descrito acima) de bancos de dados disponíveis publicamente com uma sequência de polipeptídeo e DNA de

codificação de hexoquinase 2 conhecida, tal como aquela fornecida no presente documento. As identidades são baseadas no método Clustal W de alinhamento que usa os parâmetros predeterminados de GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0,1, e séries de Gonnet 250 de matriz de peso de proteína.

[0302] A modificação de hexoquinase 2 em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento para reduzir ou eliminar a atividade de hexoquinase 2 pode ser confirmada com o uso de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a interrupção de hexoquinase 2 pode ser confirmada com a triagem de PCR com o uso de Iniciadores externos ao gene de hexoquinase 2, ou através de Southern blot com o uso de uma sonda projetada para a sequência de gene de hexoquinase 2. Alternativamente, um indivíduo pode examinar cepas de nocaute de hexoquinase 2 supostas para rendimento de biomassa aumentado em meios contendo glicose.

[0303] Os exemplos de modificações adicionais que podem ser úteis em células fornecidas no presente documento incluem as modificações para reduzir a interrupção e/ou atividade de glicerol-3-fosfato desidrogenase em pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo que tem atividade de piruvato descarboxilase ou uma interrupção em pelo menos um gene que codifica um elemento regulador que controla a expressão de gene de piruvato descarboxilase conforme descrita na Publicação de Pedido de Patente nº U.S. 2009/0305363 (incorporada no presente documento a título de referência), modificações para uma célula hospedeira que fornece um fluxo de carbono aumentado através de uma Via de Entner-Doudoroff ou reduzindo o equilíbrio de equivalentes conforme descrito na Publicação de Pedido de Patente nº U.S. 2010/0120105 (incorporada no presente documento a título de referência). Outras modificações incluem integração de pelo menos um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que catalisa uma etapa em uma via biossintética que

utiliza piruvato descrita na Publicação de Pedido de PCT nº WO 2012/033832, que está incorporada integralmente no presente documento a título de referência. Uma modificação genética que tem o efeito de redução da repressão de glicose em que a célula hospedeira de produção de levedura é *pdc-* está descrita na Publicação de Pedido de nº U.S. 2011/0124060, que está incorporada integralmente no presente documento a título de referência.

[0304] A Publicação de Pedido U.S. nº 20120064561 A1, que está incorporada no presente documento a título de referência, revela células hospedeiras recombinantes que compreendem (a) pelo menos um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de diidroxí-ácido desidratase; e (b)(i) pelo menos uma deleção, mutação e/ou substituição em um gene endógeno que codifica um polipeptídeo que afeta a biossíntese de agrupamento Fe-S; e/ou (ii) pelo menos um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo que afeta a biossíntese de agrupamento Fe-S. Nas realizações, o polipeptídeo que afeta a biossíntese de agrupamento Fe-S é codificado por *AFT1*, *AFT2*, *FRA2*, *GRX3* ou *CCC1*. Nas realizações, o polipeptídeo que afeta a biossíntese de agrupamento Fe-S é mutante constitutivo *AFT1* L99A, *AFT1* L102A, *AFT1* C291 F, ou *AFT1* C293F.

[0305] Adicionalmente, as células hospedeiras podem compreender polinucleotídeo heterólogos que codificam a polipeptídeos com atividade de fosfoacetolase e/ou um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo com atividade de fosfotransacetilase tal como, por exemplo, aqueles codificados através de SEQ ID NOs: 962 e 963 e, conforme descrito na Publicação de Pedido de PCT nº WO 2011/159853, que está incorporada integralmente no presente documento a título de referência.

### **ISOBUTANOL E OUTROS PRODUTOS**

[0306] Nas realizações da invenção, os métodos para a produção de um produto de uma via biossintética são fornecidos que compreendem (a)



fornecer uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento; e (b) cultivar a célula hospedeira sob condições nas quais o produto da via biossintética é produzido. Em outras realizações, o produto é produzido como um coproduto juntamente com o etanol. Em ainda outras realizações, o produto da via biossintética é isobutanol.

[0307] Em outras realizações da invenção, o produto da via biossintética é produzido em uma quantidade ou rendimento maior comparado à produção do mesmo produto em uma célula hospedeira recombinante que não compreende aldeído desidrogenase e/ou atividade de aldeído oxidase e/ou atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada. Nas realizações, rendimento é aumentado em pelo menos aproximadamente 2%, pelo menos aproximadamente 5% ou pelo menos aproximadamente 10%. Nas realizações, esse rendimento maior inclui a produção em um rendimento superior a aproximadamente 10% de teórico, em um rendimento de superior a aproximadamente 20% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 25% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 30% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 40% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 50% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 60% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 70% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 75% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 80% de teórico em um rendimento superior a aproximadamente 85% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 90% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 95% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 96% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 97% de teórico, em um rendimento superior a

aproximadamente 98% de teórico, em um rendimento superior a aproximadamente 99% de teórico ou em um rendimento de aproximadamente 100% de teórico. Em outras realizações, o produto é produzido como um coproduto juntamente com o etanol. Em ainda outras realizações, o produto da via biossintética é isobutanol.

[0308] Qualquer produto de uma via biossintética que tem a conversão de isobutiraldeído para ácido isobutírico como um subproduto de via pode ser produzido com eficácia superior em uma célula hospedeira recombinante revelada no presente documento que tem a modificação descrita de atividade de aldeído desidrogenase e/ou aldeído oxidase. Uma lista de tais produtos inclui, mas sem limitação, isobutanol.

#### **HOSPEDEIROS MICROBIANOS PARA PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL**

[0309] Os hospedeiros microbianos para a produção de isobutanol podem ser selecionados entre bactérias, cianobactérias, fungos filamentosos e leveduras. O hospedeiro microbiano usado para a produção de butanol deve ser tolerante ao isobutanol de modo que o rendimento não seja limitado pela toxicidade do butanol. Embora mutantes tolerantes ao butanol tenham sido isolados a partir de *Clostridia* solventogênica, poucas informações estão disponíveis em relação à tolerância ao butanol de outras cepas bacterianas potencialmente úteis. A maioria dos estudos na comparação da tolerância ao álcool em bactérias sugere que o butanol é mais tóxico do que o etanol (de Cavalho, *et al.*, Microsc. Res. Tech., 64: 215 a 22, 2004) e (Kabelitz, *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 220: 223 a 227, 2003, Tomas, *et al.*, J. Bacteriol., 186: 2006 a 2018, 2004) reporta que o rendimento de 1-butanol durante a fermentação em *Clostridium acetobutylicum* pode ser limitado através de toxicidade do 1-butanol. O efeito primário do 1-butanol em *Clostridium acetobutylicum* é a interrupção de funções de membrana (Hermann *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 50: 1238 a 1243, 1985).

[0310] Os hospedeiros microbianos selecionados para a produção de isobutanol devem ser tolerantes ao isobutanol e devem ter capacidade para converter carboidratos para isobutanol. Os critérios para a seleção de hospedeiros microbianos adequados incluem os seguintes: tolerância intrínseca ao isobutanol, taxa alta de utilização de glicose, disponibilidade de ferramentas genéticas para manipulação de gene e a habilidade para gerar alterações cromossômicas estáveis.

[0311] As cepas hospedeiras adequadas com uma tolerância ao isobutanol podem ser identificadas através de triagem baseada na tolerância intrínseca da cepa. A tolerância intrínseca de micróbios ao isobutanol pode ser medida determinando-se a concentração de isobutanol que é responsável por 50% de inibição da taxa de cultivo ( $IC_{50}$ ) quando cultivado em um meio mínimo. Os valores de  $IC_{50}$  podem ser determinados com o uso de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os micróbios de interesse podem ser cultivados na presença de várias quantidades de isobutanol e a taxa de cultivo monitorada medindo-se a densidade óptica em 600 nanômetros. O tempo de duplicação pode ser calculado a partir da parte logarítmica da curva de cultivo e usado como uma medida da taxa de cultivo. A concentração de isobutanol que produz 50% de inibição de cultivo pode ser determinada a partir de um gráfico da inibição percentual de cultivo contra a concentração de isobutanol. Em uma realização, a cepa hospedeira tem um  $IC_{50}$  para isobutanol superior a aproximadamente 0,5%.

[0312] O hospedeiro microbiano para a produção de isobutanol também deve utilizar glicose em uma taxa alta. A maioria dos micróbios tem capacidade para metabolizar carboidratos. Entretanto, determinados micróbios ambientais não podem metabolizar carboidratos para eficiência alta e, portanto, não podem ser hospedeiros adequados.

[0313] A habilidade para modificar geneticamente o hospedeiro é essencial para a produção de qualquer micro-organismo recombinante. O

modo de tecnologia de transferência de gene pode ser através de eletroporação, conjugação, transdução ou transformação natural. Uma ampla gama de plasmídeos conjugativo de hospedeiro e marcadores de resistência a fármaco está disponível. Os vetores de clonagem são adaptados aos micro-organismos hospedeiros com base na natureza de marcadores de resistência antibiótica que podem funcionar nesse hospedeiro.

[0314] O hospedeiro microbiano também deve ser manipulado a fim de inativar vias concorrentes para fluxo de carbono através da deleção de vários genes. Isso exige a disponibilidade de transposões para inativação direta ou vetores de integração cromossômica. Adicionalmente, o hospedeiro de produção deve ser sensível a mutagênese química de modo que as mutações para aprimorar a tolerância ao isobutanol intrínseca possam ser obtidas.

[0315] Com base nos critérios descritos acima, os hospedeiros microbianos adequados para a produção de isobutanol incluem, mas sem limitação, membros dos gêneros *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Pichia*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. Os hospedeiros adequados incluem: *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em algumas realizações, a célula hospedeira é *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras *S. cerevisiae* são conhecidas na técnica e estão disponíveis a partir de uma variedade de fontes, incluindo, mas sem limitação, American Type Culture Collection (Rockville, MD), Centraalbureau voor Schimmelculturas (CBS) Fungal Biodiversity Centre, LeSaffre, Gert Strand AB, Ferm Solutions, North

American Bioproducts, Martrex e Lallemand. As *S. cerevisiae* incluem, mas sem limitação, BY4741, CEN.PK 113-7D, levedura Ethanol Red®, levedura Ferm Pro™, levedura Bio-Ferm® XR, levedura de álcool Gert Strand Prestige Batch Turbo, levedura Gert Strand Pot Distillers, levedura Gert Strand Distillers Turbo, levedura FerMax™ Green, levedura FerMax™ Gold, levedura Thermosacc®, BG-1, PE-2, CAT-1, CBS7959, CBS7960 e CBS7961.

### **CONSTRUÇÃO DE HOSPEDEIRO DE PRODUÇÃO**

[0316] Os micro-organismos recombinantes que contêm os genes necessários que irão codificar a via enzimática para a conversão de um substrato de carbono fermentável para butanol podem ser construídos com o uso de conjuntos de procedimentos bem conhecidos na técnica. Na presente invenção, os genes que codificam as enzimas de uma das vias biossintéticas de isobutanol da invenção, por exemplo, acetolactato sintase, ácido acetohidróxi isomeroreductase, ácido acetohidróxi desidratase, acetoácido de cadeia ramificada descarboxilase e álcool de cadeia ramificada desidrogenase, podem ser isolados a partir de várias fontes, conforme descrito acima.

[0317] Os métodos de obtenção de genes desejados a partir de um genoma são comuns e bem conhecidos na técnica de biologia molecular. Por exemplo, se a sequência do gene for conhecida, as bibliotecas genômicas adequadas podem ser criadas através da restrição de digestão de endonuclease e podem ser submetidas à triagem com sondas complementares à sequência de gene desejada. Uma vez que a sequência é isolada, o DNA pode ser amplificado com o uso de métodos de amplificação direcionados por iniciador padrão tal como reação de cadeia de polimerase (documento U.S. 4.683.202) para obter quantidades de DNA adequadas para a transformação com o uso de vetores apropriados. As ferramentas para otimização de códon para expressão em um hospedeiro heterólogo estão prontamente disponíveis.

Algumas ferramentas para a otimização de códon estão disponíveis com base no teor de GC do micro-organismo hospedeiro.

[0318] Uma vez que os genes de via relevantes são identificados e isolados, os mesmos podem ser transformados em hospedeiros de expressão adequados por meios bem conhecidos na técnica. Os vetores ou cassetes úteis para a transformação de uma variedade de células hospedeiras são comuns e comercialmente disponíveis a partir de companhias tais como EPICENTRE® (Madison, WI), Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA), Stratagene (La Jolla, CA) e New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Tipicamente, o vetor ou cassete contém as sequências que direcionam a transcrição e tradução do gene relevante, um marcador selecionável e sequências que permitem replicação autônoma ou integração cromossômica. Os vetores adequados compreendem uma região 5' do gene que abriga controles de iniciação transcricionais e uma região 3' do fragmento de DNA que controla terminação transcricional. Ambas as regiões de controle podem ser derivadas de genes homólogos à célula hospedeira transformada, embora deva-se entender que tais regiões de controle também possam ser derivadas de genes que não são nativos às espécies específicas escolhidas como um hospedeiro de produção.

[0319] Os promotores ou regiões de controle de iniciação, que são úteis para acionar a expressão das regiões de codificação de via relevante na célula hospedeira desejada são inúmeros e familiares àqueles indivíduos versados na técnica. Virtualmente, qualquer promotor que tem capacidade para acionar esses elementos genéticos, incluindo aqueles usados nos Exemplos, é adequado para a presente invenção incluindo, mas sem limitação, *CYC1*, *HIS3*, *GAL1*, *GAL10*, *ADH1*, *PGK*, *PH05*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO*, *TPI* (úteis para a expressão em *Saccharomyces*); *AOX1* (útil para a expressão em *Pichia*); e *lac*, *ara*, *tet*, *trp*, *IP<sub>L</sub>*, *IP<sub>R</sub>*, *T7*, *tac* e *trc* (úteis para a expressão em *Escherichia coli*, *Alcaligenes* e *Pseudomonas*) assim como os promotores *amy*,

*apr*, *npr* e vários promotores de fago úteis para a expressão em *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Paenibacillus macerans*. Para as células hospedeiras recombinantes de levedura, vários promotores podem ser usados na construção de cassetes de expressão para genes, incluindo, mas sem limitação, os promotores constitutivos a seguir adequados para uso em levedura: FBA1, TDH3 (GPD), ADH1, ILV5 e GPM1; e os promotores induzíveis a seguir adequados para uso em levedura: GAL1, GAL10, OLE1 e CUP1. Outros promotores de levedura incluem promotores híbridos UAS(PGK1)-FBA1p (SEQ ID NO: 406), UAS(PGK1)-EN02p (SEQ ID NO: 538), UAS(FBA1)-PDC1p (SEQ ID NO: 539), UAS(PGK1)-PDC1p (SEQ ID NO: 540) e UAS(PGK)-OLE1p (SEQ ID NO: 541).

[0320] Os promotores, terminadores transcricionais e regiões de codificação podem ser clonados em um plasmídeo de micron de levedura 2 e transformados em células de levedura (Ludwig, *et al.* Gene, 132. 33 a 40, 1993, Publicação de Pedido nº U.S. 20080261861A1).

[0321] O ajuste da quantidade de expressão de gene em um dado hospedeiro pode ser alcançado variando-se o nível de transcrição, tal como através de seleção de promotores nativos ou artificiais. Além disso, conjuntos de procedimentos tal como o uso de bibliotecas de promotor para alcançar os níveis desejados de transcrição de gene são bem conhecidos na técnica. Tais bibliotecas podem ser geradas com o uso de conjuntos de procedimentos conhecidos na técnica, por exemplo, através de clonagem de fragmentos de cDNA aleatórios na frente de cassetes de genes (Goh *et al.* (2002) AEM 99, 17025), através de modulação de sequências reguladoras presentes dentro dos promotores (Ligr *et al.* (2006) *Genetics* 172, 2113), ou através de mutagênese de sequências de promotor conhecidas (Alper *et al.* (2005) PNAS, 12678; Nevoigt *et al.* (2006) AEM 72, 5266).

[0322] As regiões de controle de terminação também podem ser derivadas a partir de vários genes nativos aos hospedeiros. Opcionalmente, um sítio de terminação pode ser desnecessário ou pode ser incluído.

[0323] Determinados vetores tem capacidade para replicar em uma ampla gama de bactérias de hospedeiro e podem ser transferidos através de conjugação. A sequência completa e anotada de pRK404 e três vetores relacionados-pRK437, pRK442 e pRK442(H) estão disponíveis. Esses derivados provaram ser ferramentas válidas para manipulação genética em bactérias gram-negativas (Scott *et al.*, Plasmídeo, 50: 74 a 79, 2003). Vários derivados de plasmídeo de plasmídeo RSF1010 de Inc P4 de ampla gama de hospedeiro também estão disponíveis com promotores que podem funcionar em uma gama de bactérias gram-negativas. Os plasmídeos pAYC36 e pAYC37 têm promotores ativos juntamente com múltiplos sítios de clonagem para permitir a expressão de gene heterólogo em bactérias gram-negativas.

[0324] As ferramentas de substituição de gene cromossômico também estão amplamente disponíveis. Por exemplo, uma variante termossensível do replicação pWV101 de ampla gama de hospedeiro foi modificada para construir um plasmídeo pVE6002 que pode ser usado para efetuar a substituição de gene em uma gama de bactérias gram-positivas (Maguin *et al.*, J. Bacterid., 174: 5633 a 5638, 1992). Adicionalmente, os transpossomos in vitro estão disponíveis para criar mutações aleatórias em uma variedade de genomas a partir de fontes comerciais tal como EPICENTRE®.

[0325] A expressão de uma via biossintética de butanol em vários hospedeiros microbianos está descrita em mais detalhes abaixo.

#### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL EM *E. COLI***

[0326] Os vetores ou cassetes úteis para a transformação de *E. coli* são comuns e comercialmente disponíveis a partir das companhias listadas acima. Por exemplo, os genes de uma via biossintética de isobutanol podem



ser isolados a partir de várias fontes, clonados em um vetor pUC19 modificado e transformados em *E. coli* NM522.

### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL EM *RHODOCOCCUS***

#### **ERYTHROPOLIS**

[0327] Uma série de vetores de transporte de *E. coli-Rhodococcus* estão disponíveis para a expressão em *R. erythropolis*, incluindo, mas sem limitação, pRhBR17 e pDA71 (Kostichka *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 62: 61 a 68, 2003). Adicionalmente, uma série de promotores estão disponíveis para a expressão de gene heterólogo em *R. erythropolis* (Nakashima *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 70: 5557 a 5568, 2004 e Tao *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 68: 346 a 354, 2005). A interrupção de gene direcionada de genes cromossômicos em *R. erythropolis* pode ser criada com o uso do método descrito por Tao *et al.*, supra, e Brans *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., 66: 2029 a 2036, 2000).

[0328] Os genes heterólogos exigidos para a produção de isobutanol, conforme descrito acima, podem ser clonados inicialmente em pDA71 ou pRhBR71 e transformados em *E. coli*. Em seguida, os vetores podem ser transformados em *R. erythropolis* através de eletroporação, conforme descrito por Kostichka *et al.*, supra. Os recombinantes podem ser cultivados em meio sintético que contém glicose e a produção de isobutanol pode ser seguida com o uso de métodos conhecidos na técnica.

### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL EM *B. SUBTILIS***

[0329] Os métodos para a expressão de gene e criação de mutações em *B. subtilis* também são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, os genes de uma via biossintética de isobutanol podem ser isolados a partir de várias fontes, clonados em um vetor pUC19 modificado e transformados em *Bacillus subtilis* BE1010. Adicionalmente, os cinco genes de uma via biossintética de isobutanol podem ser divididos em dois operões para a

expressão. Os três genes da via (*bubB*, *ilvD* e *kivD*) podem ser integrados no cromossomo de *Bacillus subtilis* BE1010 (Payne, *et al.*, J. Bacteriol., 173, 2278 a 2282, 1991). Os dois genes restantes (*ilvC* e *bdhB*) podem ser clonados em um expressão vetor e transformados na cepa *Bacillus* que transporta os genes de isobutanol integrados.

#### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL EM *B. LICHENIFORMIS***

[0330] A maioria dos plasmídeos e vetores de transporte que replicam em *B. subtilis* podem ser usados para transformar *B. licheniformis* através de transformação protoplástica ou eletroporação. Os genes exigidos para a produção de isobutanol podem ser clonados em derivados de plasmídeos pBE20 ou pBE60 (Nagarajan *et al.*, Gene, 114: 121 a 126, 1992). Os métodos para transformar *B. licheniformis* são conhecidos na técnica (Fleming *et al.* Appl. Environ. Microbiol., 61: 3775 a 3780, 1995). Os plasmídeos construídos para a expressão em *B. subtilis* podem ser transformados em *B. licheniformis* para produzir um hospedeiro microbiano recombinante que produz isobutanol.

#### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL EM *PAENIBACILLUS MACERANS***

[0331] Os plasmídeos podem ser construídos conforme descrito acima para a expressão em *B. subtilis* e usados para transformar *Paenibacillus macerans* através de transformação protoplástica para produzir um hospedeiro microbiano recombinante que produz isobutanol.

#### **EXPRESSÃO DA VIA BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL EM *ALCALIGENES (RALSTONIA)***

##### **EUTROPHUS**

[0332] Os métodos para a expressão de gene e criação de mutações em *Alcaligenes eutrophus* são conhecidos na técnica (Taghavi *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 60: 3585 a 3591, 1994). Os genes para uma via biossintética de isobutanol podem ser clonados em qualquer um dos vetores de ampla gama de hospedeiro descritos acima, e eletroporados para gerar

recombinantes que produzem isobutanol. A via de poli(hidroxibutirato) em *Alcaligenes* foi descrita em detalhes, uma variedade de conjuntos de procedimentos genéticos para modificar o genoma de *Alcaligenes eutrophus* é conhecida, e aquelas ferramentas podem ser aplicadas para engenharia de uma via biossintética de isobutanol.

#### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL EM *PSEUDOMONAS PUTIDA***

[0333] Os métodos para a expressão de gene em *Pseudomonas putida* são conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, Ben-Bassat *et al.*, Patente nº U.S. 6.586.229, que está incorporada no presente documento a título de referência). Os genes de via de butanol podem ser inseridos em pPCU18 e esse DNA ligado pode ser eletroporado em células DOT-T1 C5aAR1 de *Pseudomonas putida* eletrocompetentes para gerar recombinantes que produzem isobutanol.

#### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSSINTÉTICA DE BUTANOL EM *SACCHAROMYCES***

##### **CEREVISIAE**

[0334] Os métodos para a expressão de gene em *Saccharomyces cerevisiae* são conhecidos na técnica (por exemplo, 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). A expressão de genes em levedura exige tipicamente um promotor, seguido pelo gene de interesse, e um terminador transcricional. Vários promotores de levedura, incluindo aqueles usados nos Exemplos no presente documento, podem ser usados na construção de cassetes de expressão para os genes que codificam uma via biossintética de isobutanol, incluindo, mas sem limitação, os promotores constitutivos FBA, GPD, ADH1 e GPM, e os promotores induzíveis GAL1, GAL10 e CUP1. Os terminadores transcricionais adequados incluem, mas sem limitação, FBA<sub>t</sub>, GPD<sub>t</sub>, GPM<sub>t</sub>, ERG10<sub>t</sub>, GAL1<sub>t</sub>, CYC1 e ADH1. Por exemplo, os promotores adequados, os

terminadores transcrpcionais e os genes de uma via biossintética de isobutanol podem ser clonados em vetores de transporte de levedura *E. coli* e transformados em células de levedura conforme descrito na Publicação de Pedido de nº U.S. 20100129886. Esses vetores permitem a propagação de cepa tanto em *E. coli* quanto em cepas de levedura. Tipicamente, o vetor contém um marcador selecionável e sequências que permitem a replicação autônoma ou integração cromossômica no hospedeiro desejado. Tipicamente, os plasmídeos usados em levedura são vetores de transporte pRS423, pRS424, pRS425 e pRS426 (American Type Cultura Collection, Rockville, MD), que contêm uma origem de replicação de *E. coli* (por exemplo, pMB1), uma origem de replicação de levedura de 2 $\mu$  e um marcador para 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 de vetores de expressão com genes que codificam os polipeptídeos de interesse pode ser realizada através de conjuntos de procedimentos de clonagem molecular padrões em *E. coli* ou através do método de recombinação de reparo de intervalo em levedura.

[0335]A abordagem de clonagem de reparo de intervalo leva vantagem da recombinação homóloga altamente eficiente em levedura. Tipicamente, um DNA de vetor de levedura é digerido (por exemplo, no sítio de clonagem múltipla do mesmo) para criar um "intervalo" na sequência do mesmo. Vários DNAs de inserção de interesse são gerados que contêm uma sequência bp  $\geq 21$  em ambas as terminações 5' e 3' que se sobrepõem sequencialmente uma com a outra, e com os terminais 5' e 3' do vetor DNA. Por exemplo, para construir um vetor de expressão de levedura para o "Gene X", um promotor de levedura e um terminador 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

organismo de fonte do mesmo ou obtido a partir de um vetor de clonagem que compreende a sequência de Gene X. Há pelo menos uma sequência de sobreposição 21 bp entre a terminação 5' do vetor linearizado e a sequência de promotor, entre o promotor e o Gene X, entre o Gene X e a sequência de terminador, e entre o terminador e a terminação 3' do vetor linearizado. O vetor “com intervalos” e os DNAs de inserção são cotransformados, em seguida, em uma cepa de levedura e plaqueados no meio que contém as misturas de composto apropriadas que permitem a complementação dos marcadores de seleção nutricional nos plasmídeos. A presença de combinações de inserção corretas pode ser confirmada através de mapeamento de PCR com o uso de DNA de plasmídeo preparado a partir das células selecionadas. O DNA de plasmídeo isolado a partir de levedura (normalmente baixo em concentração) pode ser transformado, em seguida, em uma cepa *E. coli*, por exemplo, *TOP10*, seguido por minipreparações e mapeamento de restrição para verificar adicionalmente o construto de plasmídeo. Finalmente, o construto pode ser verificado através de análise de sequência.

[0336] Como a técnica de reparo de intervalo, a integração no genoma de levedura também leva vantagem do sistema de recombinação homóloga em levedura. Tipicamente, um cassete que contém uma região de codificação mais elementos de controle (promotor e terminador) e marcador auxotrófico é amplificado por PCR com um DNA polimerase de alta fidelidade com o uso de Iniciadores que hibridizam ao cassete e contém 40 a 70 pares de base de homologia de sequência às regiões 5' e 3' da área genômica em que a inserção é desejada. Em seguida, o produto de PCR é transformado em levedura e plaqueado em meio que contém as misturas de composto apropriadas que permitem a seleção para o marcador auxotrófico integrado. Por exemplo, para integrar o "Gene X" na localização cromossômica "Y", o

construto de terminador de região de codificação X de promotor é amplificado por PCR a partir de um construto de DNA de plasmídeo e unido a um marcador autotrófico (tal como URA3) através de SOE PCR ou através de clonagem e digestões de restrição comum. O cassete completo, contendo a região URA3 de terminador de região de codificação X de promotor, é amplificado por PCR com sequências de iniciador que contêm 40 a 70 bp de homologia às regiões 5' e 3' de localização "Y" no cromossomo de levedura. O produto de PCR é transformado em levedura e selecionado em meios de cultivo sem uracila. Os transformantes podem ser verificados através de PCR de colônia ou através de sequenciamento direto de DNA cromossômico.

#### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSINTÉTICA DE BUTANOL EM LACTOBACILLUS PLANTARUM**

[0337] O gênero *Lactobacillus* pertence à família *Lactobacillales* e muitos plasmídeos e vetores usados na transformação de *Bacillus subtilis* e *Streptococcus* podem ser usados para *Lactobacillus*. Os exemplos não limitantes de vetores adequados incluem pAM $\beta$ 1 e derivados do mesmo (Renault *et al.*, Gene 183: 175 a 182, 1996); e (O'Sullivan *et al.*, Gene, 137: 227 a 231, 1993); pMBB1 e pHW800, um derivado de pMBB1 (Wyckoff *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 62: 1481 a 1486, 1996); pMG1, um plasmídeo conjugativo (Tanimoto *et al.*, J. Bacteriol., 184: 5800 a 5804, 2002); pNZ9520 (Kleerebezem *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 63: 4581 a 4584, 1997); pAM401 (Fujimoto *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 67: 1262 a 1267, 2001); e pAT392 (Arthur *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 38: 1899 a 1903, 1994). Vários plasmídeos de *Lactobacillus plantarum* também foram reportados (van Kranenburg R, *et al.* Appl. Environ. Microbiol., 71: 1223 a 1230, 2005).

#### **EXPRESSÃO DE UMA VIA BIOSINTÉTICA DE BUTANOL EM VÁRIAS ESPÉCIES**

##### **ENTEROCOCCUS (E. FAECIUM, E. GALLINARIUM E E. FAECALIS)**

[0338] O gênero *Enterococcus* pertence à família *Lactobacillales* e muitos plasmídeos e vetores usados na transformação de espécies *Lactobacilli*,

*Bacilli* e *Streptococci* podem ser usados para espécies *Enterococcus*. Os exemplos não limitantes de vetores adequados incluem pAM $\beta$ 1 e derivados do mesmo (Renault *et al.*, Gene, 183: 175 a 182, 1996); e (O'Sullivan *et al.*, Gene, 137: 227 a 231, 1993); pMBB1 e pHW800, um derivado de pMBB1 (Wyckoff *et al.* Appl. Environ. Microbiol., 62: 1481 a 1486, 1996); pMG1, um plasmídeo conjugativo (Tanimoto *et al.*, J. Bacteriol., 184: 5800 a 5804, 2002); pNZ9520 (Kleerebezem *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 63: 4581 a 4584, 1997); pAM401 (Fujimoto *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 67: 1262 a 1267, 2001); e pAT392 (Arthur *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 38:, 1899 a 1903, 1994). Os vetores de expressão para *E. faecalis* com o uso do gene *nisA* de *Lactococcus* também podem ser usados (Eichenbaum *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 64: 2763 a 2769, 1998). Adicionalmente, os vetores para a substituição de gene no cromossomo *E. faecium* podem ser usados (Nallaapareddy *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 72: 334 a 345, 2006).

### **MEIOS DE FERMENTAÇÃO**

[0339] Os meios de fermentação na presente invenção devem conter substratos de carbono adequados. Os substratos adequados podem incluir, mas sem limitação, monossacarídeos tais como glicose e frutose, oligossacarídeos tais como lactose, maltose, galactose, sacarose, polissacarídeos tais como amido ou celulose ou misturas dos mesmos e misturas não purificadas de matérias-primas renováveis tais como permeato de soro de queijo, licor de milhocina, melaços de beterraba e malte de cevada. Adicionalmente, o substrato de carbono também pode ser substratos de um carbono tal como dióxido de carbono, ou metanol para o qual a conversão metabólica em intermediários bioquímicos principais foi demonstrada. Além dos substratos de um e dois carbonos, micro-organismos metilotróficos também são conhecidos por utilizar vários outros compostos contendo carbono tais como metilamina, glicosamina e uma variedade de aminoácidos para atividade

metabólica. Por exemplo, as leveduras metilotróficas são conhecidas por utilizar o carbono a partir de metilamina para formar trealose ou glicerol (Bellion *et al.*, Microb. Growth C1 Compd., [Int. Symp], 7<sup>o</sup> (1993), 415 a 32. (eds): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK). De modo similar, várias espécies de *Candida* irão metabolizar alanina ou ácido oleico (Suiter *et al.*, Arch. Microbiol., 153: 485 a 489, 1990). Portanto, contempla-se que a fonte de carbono utilizada na presente invenção pode abranger uma ampla variedade de substratos contendo carbono e somente será limitada pela escolha do micro-organismo.

[0340] Embora seja contemplado que todos os substratos de carbono mencionados acima e misturas dos mesmos são adequados na presente invenção, em algumas realizações, os substratos de carbono são glicose, frutose e sacarose, ou misturas dessas com açúcares C5 tais como xilose e/ou arabinose para células de leveduras modificadas para usar açúcares C5. A sacarose pode ser derivada a partir de fontes de açúcar renováveis tais como cana-de-açúcar, beterrabas, mandioca, sorgo doce e misturas dos mesmos. A glicose e dextrose podem ser derivadas a partir de fontes de grão renováveis através de sacarificação de matérias-primas à base de amido que incluem grãos tais como milho, trigo, centeio, cevada, aveias e misturas dos mesmos. Além disso, açúcares fermentáveis podem ser derivados a partir de biomassa lignocelulósica ou celulósica renovável através de processos de pré-tratamento e sacarificação, conforme descrito, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente nº 2007/0031918 A1, que está incorporada integralmente no presente documento a título de referência. A biomassa refere-se a qualquer material lignocelulósico ou celulósico e inclui materiais que compreendem celulose e, opcionalmente, que compreendem adicionalmente hemicelulose, lignina, amido, oligossacarídeos e/ou monossacarídeos. A biomassa também pode compreender componentes



adicionais, tais como proteína e/ou lipídio. A biomassa pode ser derivada a partir de uma única fonte, ou a biomassa pode compreender uma mistura derivada a partir de mais do que uma fonte; por exemplo, a biomassa pode compreender uma mistura de espigas de milho e palha de milho, ou uma mistura de grama e folhas. A biomassa inclui, mas sem limitação, culturas de bioenergia, resíduos de agricultura, resíduos sólidos urbanos, resíduos sólidos industriais, lama de fabricação de papel, restos culturais, resíduos florestais e de madeira. Os exemplos de biomassa incluem, mas sem limitação, grão de milho, espigas de milho, resíduos de cultura tais como cascas de milho, palha de milho, gramas, trigo, palha de trigo, cevada, palha de cevada, feno, palha de arroz, painço amarelo, resíduos de papel, bagaço de cana-de-açúcar, sorgo, soja, componentes obtidos a partir de moagem de grãos, árvores, galhos, raízes, folhas, aparas de madeira, serragem, arbustos e silvados, vegetais, frutas, flores, esterco animal e misturas dos mesmos.

[0341] Além de uma fonte de carbono apropriada, os meios de fermentação devem conter minerais, sais, cofatores, tampões e outros componentes adequados, conhecidos àqueles indivíduos versados na técnica, adequados para o cultivo das culturas e promoção da via enzimática necessária para a produção de butanol descrita no presente documento.

#### **CONDIÇÕES DE CULTURA**

[0342] Tipicamente, as células são cultivadas em uma temperatura na faixa de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C em um meio apropriado. Os meios de cultivo adequados na presente invenção são meios preparados comercialmente comuns tais como caldo de Luria Bertani (LB), caldo de Sabouraud Dextrose (SD) ou caldo de Yeast Medium (YM) ou caldo que inclui base de nitrogênio de levedura, sulfato de amônio e dextrose (como a fonte de energia/carbono) ou YPD Medium, uma mescla de peptona, extrato de levedura e dextrose em proporções ideais para o cultivo da maioria

das cepas *Saccharomyces cerevisiae*. Outros meios de cultivo sintéticos ou definidos também podem ser usados, e o meio apropriado para cultivo do micro-organismo particular será conhecido por um indivíduo versado na técnica de ciência de microbiologia ou fermentação. O uso de agentes conhecidos para modular repressão de cabólito direta ou indiretamente, por exemplo, 2',3'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), também pode ser incorporado no meio de fermentação.

[0343] As faixas de pH adequadas para a fermentação estão entre pH 5,0 a pH 9,0, em que pH 6,0 a pH 8,0 é preferencial para a condição inicial. As faixas de pH adequadas para a fermentação de levedura estão tipicamente entre aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente pH 9,0. Em uma realização, aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 8,0 é usado para a condição inicial. As faixas de pH adequadas para a fermentação de outros micro-organismos estão entre aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente pH 7,5. Em uma realização, aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 6,5 é usado para a condição inicial.

[0344] As fermentações podem ser realizadas sob condições aeróbicas ou anaeróbicas. Em uma realização, condições aeróbicas ou microaeróbicas são usadas para a fermentação.

#### **BATELADA INDUSTRIAL E FERMENTAÇÕES CONTÍNUAS**

[0345] Os presentes processos podem empregar um método do tipo batelada de fermentação. Uma fermentação do tipo batelada clássica é um sistema fechado em que a composição o meio é ajustada no início da fermentação e não é submetida a alterações artificiais durante a fermentação. Portanto, no início da fermentação, o meio é inoculado com o micro-organismo ou micro-organismos desejado(s), e a fermentação é autorizada a ocorrer sem adicionar nada ao sistema. Tipicamente, entretanto, uma fermentação do tipo “batelada” é batelada em relação à adição de fonte de carbono e tentativas são

feitas frequentemente em fatores de controle tais como concentração de oxigênio e pH. Em sistemas em batelada, as composições de metabólito e biomassa do sistema se alteram constantemente até que o momento da fermentação seja parado. Dentro de culturas em batelada, as células moderadas através de uma fase lag estática para uma fase log de cultivo alto e, finalmente, para uma fase estacionária em que a taxa de cultivo é diminuída ou interrompida. Se não tratadas, as células na fase estacionária irão morrer eventualmente. As células em fase log são responsáveis geralmente pelo volume de produção de produto final ou intermediário.

[0346] Uma variação no sistema em batelada padrão é o sistema em Batelada Alimentada. Os processos de fermentação em Batelada Alimentada também são adequados na presente invenção e compreendem um sistema em batelada típico com a exceção de que o substrato é adicionado em incrementos à medida que a fermentação progride. Os sistemas em Batelada Alimentada são úteis quando a repressão de metabólito está apta para inibir o metabolismo das células e em que é desejável ter quantidades limitadas de substrato no meio. A medição da concentração de substrato real em sistemas em Batelada Alimentada é difícil e é, portanto, estimada com base nas mudanças de fatores mensuráveis tais como pH, oxigênio dissolvido e a pressão parcial de gases residuais tal como CO<sub>2</sub>. As fermentações em Batelada Alimentada e em Batelada são comuns e bem conhecidas na técnica, e exemplos podem ser encontrados em Thomas D. Brock em Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Segunda Edição (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, ou Deshpande, Mukund (Appl. Biochem. Biotechnol., 36: 227, 1992), incorporados no presente documento a título de referência.

[0347] Embora a presente invenção seja realizada em modo de batelada, contempla-se que o método pode ser adaptável a métodos de

fermentação contínua. A fermentação contínua é um sistema aberto em que um meio de fermentação definido é adicionado continuamente a um biorreator e uma quantidade igual de meio condicionado é removida simultaneamente para o processamento. A fermentação contínua mantém geralmente as culturas em uma densidade alta constante em que as células estão primariamente em cultivo de fase log.

[0348] A fermentação contínua permite a modulação de um fator ou qualquer número de fatores que afetam o cultivo de célula ou finalizam a concentração de produto. Por exemplo, um método irá manter um nutriente limitante tal como a fonte de carbono ou nível de nitrogênio em uma taxa fixa e permitir que todos os outros parâmetros moderem. Em outros sistemas, vários fatores que afetam o cultivo podem ser alterados continuamente enquanto a concentração de célula, medida através de turvação de meio, é mantida constante. Os sistemas contínuos esforçam-se para manter condições de cultivo de estado estacionário e, conseqüentemente, a perda de célula devido ao meio que é extraído deve ser equilibrada contra a taxa de cultivo de célula na fermentação. Os métodos de modulação de nutrientes e fatores de cultivo para processos de fermentação contínuos assim como conjuntos de procedimentos para maximização da formação de taxa de produto são bem conhecidos na técnica de microbiologia industrial e uma variedade de métodos é detalhada por Brock, *supra*.

[0349] É contemplado que a presente invenção pode ser praticada com o uso de ou batelada, batelada alimentada ou processos contínuos e que qualquer modo conhecido de fermentação seria adequado. Adicionalmente, é contemplado que células podem ser imobilizadas em um substrato como catalisadores de célula inteira e sujeitas a condições de fermentação para produção de isobutanol.

### **MÉTODOS PARA ISOLAMENTO DE BUTANOL DO MEIO DE FERMENTAÇÃO**

[0350] O butanol bioproduzido pode ser isolado do meio de fermentação com o uso de métodos conhecidos na técnica para fermentações de ABE (ver, por exemplo, Durre, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:639 a 648 (1998), Groot *et al.*, *Process. Biochem.* 27:61 a 75 (1992), e referências nos mesmos). Por exemplo, sólidos podem ser removidos do meio de fermentação por centrifugação, filtração, decantação, ou semelhantes. Então, o butanol pode ser isolado do meio de fermentação com o uso de métodos tais como destilação, destilação azeotrópica, extração líquido-líquido, adsorção, esgotamento a gás, evaporação de membrana, ou pervaporação.

[0351] Como o butanol forma um ponto de ebulição baixo, mistura azeotrópica com água, destilação pode ser usada para separar a mistura até sua composição azeotrópica. Destilação pode ser usada em combinação com outro método de separação para obter separação ao redor do azeótropo. Métodos que podem ser usados em combinação com destilação para isolar e purificar butanol incluem, porém sem limitação, decantação, extração líquido-líquido, adsorção, e técnicas com base em membrana. Adicionalmente, butanol pode ser isolado com o uso de destilação azeotrópica, com o uso de um arrastante (ver, por exemplo, Doherty e Malone, *Conceptual Design of Distillation Systems*, McGraw Hill, Nova Iorque, 2001).

[0352] A mistura de butanol-água forma um azeótropo heterogêneo de modo que destilação possa ser usada em combinação com decantação para isolar e purificar o butanol. Nesse método, o butanol que contém caldo de fermentação é destilado para próximo da composição azeotrópica. Então, a mistura azeotrópica é condensada e o butanol é separado do meio de fermentação por decantação. A fase aquosa decantada pode ser retornada para a primeira coluna de destilação como refluxo. A fase

orgânica decantada rica em butanol pode ser purificada adicionalmente por destilação em uma segunda coluna de destilação.

[0353] O butanol também pode ser isolado do meio de fermentação com o uso de extração líquido-líquido em combinação com destilação. Nesse método, o butanol é extraído do caldo de fermentação com o uso de extração líquido-líquido com um solvente adequado. A fase orgânica que contém butanol é destilada, então, para separar o butanol do solvente.

[0354] Destilação em combinação com adsorção também pode ser usada para isolar butanol do meio de fermentação. Nesse método, o caldo de fermentação que contém o butanol é destilado para próximo da composição azeotrópica e, então, a água restante é removida por uso de um adsorvente, tal como tamises moleculares (Aden *et al.*, *Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover*, Relatório NREIJTP-510-32438, National Renewable Energy Laboratory, junho de 2002).

[0355] Adicionalmente, destilação em combinação com pervaporação pode ser usado para isolar e purificar o butanol do meio de fermentação. Nesse método, o caldo de fermentação que contém o butanol é destilado para próximo da composição azeotrópica, e então, a água restante é removida por pervaporação através de uma membrana hidrofílica (Guo *et al.*, *J. Membr. Sci.* 245, 199 a 210 (2004)).

[0356] Remoção de produto *in situ* (ISPR) (também referido como fermentação extrativa) pode ser usada para remover butanol (ou outro álcool fermentativo) do vaso de fermentação conforme o mesmo é produzido, que permite, desse modo, que o microorganismo produza butanol em rendimentos altos. Um método para ISPR para remover álcool fermentativo que foi descrito na técnica é extração líquido-líquido. Em geral, em relação a fermentação de butanol, por exemplo, o meio de fermentação, que inclui o microorganismo, é

colocado em contato com um agente de extração orgânico em um momento antes da concentração de butanol alcançar um nível tóxico. O agente de extração orgânico e o meio de fermentação formam uma mistura bifásica. O butanol se partilha na fase de agente de extração orgânico, que diminui a concentração na fase aquosa que contém o microorganismo, que limita, desse modo, a exposição do microorganismo ao butanol inibidor.

[0357] A extração líquido-líquido pode ser realizada, por exemplo, de acordo com os processos descritos na Publicação de Pedido de Patente nº. U.S. 2009/0305370, a revelação do qual é incorporada pelo presente documento em sua totalidade. Publicação de Pedido de Patente nº. U.S. 2009/0305370 descreve métodos para produzir e recuperar butanol de um caldo de fermentação com o uso de extração líquido-líquido, sendo que os métodos compreendem a etapa de colocar em contato o caldo de fermentação com um agente de extração imiscível em água para formar uma mistura de duas fases que compreende uma fase aquosa e uma fase orgânica. Tipicamente, o agente de extração pode ser um agente de extração orgânico selecionado do grupo que consiste de C12 a C22 álcoois graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados (e misturas dos mesmos), C12 a C22 ácidos graxos, ésteres de C12 a C22 ácidos graxos, C12 a C22 aldeídos graxos, e misturas dos mesmos. O(s) agente(s) de extração para ISPR podem ser agentes de extração não alcoólicos. O agente de extração de ISPR pode ser um agente de extração orgânico exógeno tal como álcool oleílico, álcool beenílico, álcool cetílico, álcool laurílico, álcool miristílico, álcool estearílico, 1-undecanol, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, miristato de metila, oleato de metila, undecanal, aldeído láurico, 20-metilundecanal, e misturas dos mesmos.

[0358] Em algumas realizações, o éster pode ser formado por colocar em contato o álcool em um meio de fermentação com um ácido

carboxílico (por exemplo, ácidos graxos) e um catalisador capaz de esterificar o álcool com o ácido carboxílico, conforme descrito na Publicação de Pedido nº PCT. WO/2011/159998, que é incorporado no presente documento por referência em sua totalidade. Em tais realizações, o ácido carboxílico pode servir como um agente de extração de ISPR em que os ésteres de álcool se partilham. O ácido carboxílico pode ser suprido ao vaso de fermentação e/ou derivado da biomassa que supre carbono fermentável alimentado ao vaso de fermentação. Lipídios presentes na matéria-prima podem ser cataliticamente hidrolisados em ácido carboxílico, e o mesmo catalisador (por exemplo, enzimas) pode esterificar o ácido carboxílico com o álcool. O catalisador pode ser suprido à matéria-prima antes da fermentação, ou pode ser suprido ao vaso de fermentação antes ou contemporaneamente com o suprimento da matéria-prima. Quando o catalisador é suprido ao vaso de fermentação, ésteres de álcool podem ser obtidos por hidrólise dos lipídios em ácido carboxílico e esterificação substancialmente simultânea do ácido carboxílico com butanol presente no vaso de fermentação. Ácido carboxílico e/ou óleo nativo não derivado da matéria-prima também podem ser alimentados ao vaso de fermentação, sendo que o óleo nativo é hidrolisado em ácido carboxílico. Qualquer ácido carboxílico não esterificado com o álcool pode servir como parte do agente de extração de ISPR. O agente de extração que contém ésteres de álcool pode ser separado do meio de fermentação, e o álcool pode ser recuperado do agente de extração. O agente de extração pode ser reciclado para o vaso de fermentação. Assim, no caso de produção de butanol, por exemplo, a conversão do butanol em um éster pode reduzir a concentração de butanol livre no meio de fermentação, que protege o microorganismo do efeito tóxico de aumentar concentração de butanol. Adicionalmente, grão não fracionado pode ser usado como matéria-prima sem separação de lipídios no mesmo, uma vez que os lipídios podem ser cataliticamente hidrolisados em



ácido carboxílico, que diminui, desse modo, a taxa de acúmulo de lipídios no agente de extração de ISPR.

[0359] Remoção de produto *in situ* pode ser executada em um modo de batelada ou um modo contínuo. Em um modo contínuo de remoção de produto *in situ*, produto é continuamente removido do reator. Em um modo de batelada de remoção de produto *in situ*, um volume de agente de extração orgânico é adicionado ao vaso de fermentação e o agente de extração não é removido durante o processo. Para remoção de produto *in situ*, o agente de extração orgânico pode entrar em contato com o meio de fermentação no início da fermentação, que forma um meio de fermentação bifásico. Alternativamente, o agente de extração orgânico pode entrar em contato com o meio de fermentação após o microorganismo ter alcançado uma quantidade desejada de crescimento, que pode ser determinado medindo-se a densidade óptica da cultura. Ainda, o agente de extração orgânico pode entrar em contato com o meio de fermentação em um momento em que o nível de álcool de produto no meio de fermentação alcança um nível pré-selecionado. No caso de produção de butanol de acordo com algumas realizações da presente invenção, o ácido carboxílico agente de extração pode entrar em contato com o meio de fermentação em um momento antes da concentração de butanol alcançar um nível tóxico, de modo a esterificar o butanol com o ácido carboxílico para produzir ésteres de butanol e conseqüentemente reduzir a concentração de butanol no vaso de fermentação. A fase orgânica que contém éster pode ser removida, então, do vaso de fermentação (e separada do caldo de fermentação que constitui a fase aquosa) após uma titulação eficaz desejada dos ésteres de butanol ser alcançado. Em algumas realizações, a fase orgânica que contém éster é separada da fase aquosa após fermentação do açúcar fermentável disponível no vaso de fermentação ser substancialmente completada.

### **EXEMPLOS**

[0360] A presente invenção é definida adicionalmente nos Exemplos a seguir. Deve ser entendido que esses Exemplos, embora indiquem realizações preferidas da invenção, são proporcionados por meio de ilustração somente. A partir da discussão acima e desses Exemplos, um indivíduo versado na técnica pode averiguar as características essenciais dessa invenção, e sem desviar do espírito e escopo da mesma, pode fazer várias alterações e modificações da invenção para adaptar a mesma a vários usos e condições.

### **MÉTODOS GERAIS**

[0361] Técnicas de clonagem molecular e DNA recombinante padrão usadas nos Exemplos são bem conhecidas na técnica e são descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, por T. J. Silhavy, M. L. Bennan, e L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1984, e por Ausubel, F. M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, N.Y., 1987.

[0362] Materiais e métodos adequados para a manutenção e crescimento de culturas bacterianas também são bem conhecidos na técnica. Técnicas adequadas para uso nos Exemplos a seguir podem ser encontradas em 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. Briggs Phillips, eds., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994, ou por Thomas D. Brock em Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Segunda Edição, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1989. Todos os reagentes, enzimas de restrição e materiais usados para o crescimento e manutenção de células bacterianas foram obtidos de Aldrich

Chemicals (Milwaukee, WI), BD Diagnostic Systems (Sparks, MD), Life Technologies (Rockville, MD), ou Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), a menos que especificado de outro modo.

[0363] O significado de abreviações usadas é como se segue: "Å" significa Angstrom, "min" significa minuto(s), "h" significa hora(s), "µl" significa microlitro(s), "ng/µl" significa nano grama por microlitro, "pmol/µl" significa pico mol por microlitro, "ml" significa mililitro(s), "L" significa litro(s), "g/L" significa grama por litro, "ng" significa nano grama, "seg" significa segundo(s), "ml/min" significa mililitro por minuto(s), "p/v" significa peso por volume, "v/v" significa volume por volume, "nm" significa nanometro(s), "mm" significa milimetro(s), "cm" significa centímetro(s), "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "g" significa grama(s), "µg" significa micrograma(s), "mg" significa miligrama(s), "g" significa a constante de gravidade, "rpm" significa revoluções por minuto, "HPLC" significa cromatografia de líquido de alto desempenho, "MS" significa espectrometria de massa, "HPLC/MS" significa cromatografia de líquido de desempenho alto/espectrometria de massa, "EDTA" significa etilendiamina-ácido tetraacético, "dNTP" significa trifosfato de deoxinucleotídeo, "°C" significa graus Celsius, e "V" significa tensão.

#### **ENSAIO DE TRIAGEM DE PRODUTIVIDADE ALTA DE BIBLIOTECAS DE GENE**

[0364] Triagem de produtividade alta das bibliotecas de gene de enzimas de KARI mutantes foi realizada conforme descrito no presente documento (com a exceção de Exemplos 16 e 21): meio de congelamento de 10x que contém 554,4 g/L de glicerol, 68 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 17 mM de citrato de sódio, 132 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 36 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  foram preparados com água molecularmente pura e esterilizada por filtro. Meio de congelamento foi preparado diluindo-se o meio de congelamento de 10x com o meio de LB. Uma alíquota (200 µl) do meio de congelamento foi usada para

cada cavidade das placas de arquivamento de 96 cavidades (n° cat3370, Corning Inc. Corning, NY).

[0365] Clones das placas de ágar de LB foram selecionados e inoculados nas placas de arquivamento de 96 cavidades que contêm o meio de congelamento e cresceram ao longo da noite em 37°C sem agitação. As placas de arquivamento foram armazenadas, então, em -80°C. Cepa de *E. coli* Bw25113 transformada com *pBAD-HisB* (Invitrogen) foi sempre usada como o controle negativo. Os controles positivos para as bibliotecas nos Exemplos 3, 4, e 5 são do tipo selvagem KARI de K9, AB1D3, AB1D3 respectivamente.

[0366] Clones de placas de arquivamento foram inoculados nas placas de 96 cavidades profundas. Cada cavidade continha 3,0 µl de células de placas de arquivamento descongeladas, 200 µl do meio de LB que contém 100 µg/ml de ampicilina e 0,02%(p/v) de arabinose como o indutor. Células foram cultivadas ao longo da noite em 37°C com 80% umidade com agitação (900 rpm), colhidas por centrifugação (4000 rpm, 5 min em 25°C). (centrífuga Eppendorf, Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY) e a pélete de célula foi armazenada em -20°C para análise posterior. O substrato de ensaio, (*R,S*)-acetolactato, foi sintetizado conforme descrito por Aulabaugh e Schloss (Aulabaugh e Schloss, *Biochemistry*, 29: 2824 a 2830, 1990). Todos os outros produtos químicos usados no ensaio foram adquiridos junto à Sigma.

[0367] A conversão enzimática de acetolactato para  $\alpha,\beta$ -dihidroxiisovalerato por KARI foi seguida medindo-se o desaparecimento do cofator, NADPH ou NADH, da reação em 340 nm com o uso de um leitor de placa (Molecular Device, Sunnyvale, CA). A atividade foi calculada com o uso do coeficiente de extinção molar de  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para ou NADPH ou NADH. As soluções mãe usadas foram:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,2 M);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 M); EDTA (0,5 M);  $\text{MgCl}_2$  (1,0 M); NADPH (2,0 mM); NADH (2,0 mM) e acetolactato (45 mM). Sendo que os 100 ml de tampão de reação (pH 6,8) contêm: 2,0 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,

3,0 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,0 ml de  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 ml de EDTA e 90,9 ml de água foram preparados.

[0368] Péletes de célula congelada em placas de cavidade profunda e BugBuster foram aquecidos em temperatura ambiente por 30 min ao mesmo tempo. Cada cavidade de placas de ensaio de 96 cavidades foi preenchida com 120  $\mu\text{l}$  do tampão de reação e 20  $\mu\text{l}$  de NADH (2,0 mM). 75  $\mu\text{l}$  de 50% BugBuster (v/v em água) foram adicionados a cada cavidade após aquecimento de 30 min e células foram suspensas com o uso de agitador de placa. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 min. Uma alíquota (15 a 25  $\mu\text{l}$  dependendo da atividade esperada) de lisato de célula foi transferida para cada cavidade de placas de ensaio de 96 cavidades. Absorbância de 340 nm foi relatada como base, 16  $\mu\text{l}$  de acetolactato (4,5 mM, diluídos com o tampão de reação) foram adicionados a cada cavidade e misturados com agitação pelo leitor de placa. Absorbância de 340 nm foi relatada em 0, e 10 a 30 minutos dependendo da atividade esperada após adição de substrato. A diferença em absorbância (antes e após adição de substrato) foi usada para determinar a atividade dos mutantes. Mutantes com atividade de KARI maior comparados ao controle positivo foram selecionados para retriagem.

[0369] O número de clones submetidos a triagem para as bibliotecas em Exemplo 1, 2 e 3 são de cerca de 12.000, 12.000 e 92 respectivamente. Os maiores atuantes de cada biblioteca foram submetidos a triagem novamente como descrito abaixo como ensaio secundário.

#### **ENSAIO SECUNDÁRIO DE MUTANTES ATIVOS**

[0370] Células que contêm mutantes selecionados identificados por triagem de produtividade alta (acima) foram cultivadas ao longo da noite, em 37°C, em 3,0 ml do meio de LB que contém 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina e 0,025%(p/v) de arabinose como o indutor com agitação em 250 rpm. As células

foram aliquotadas, então, em placas de 96 cavidades profundas (200 µl por cavidade) e colhidas por centrifugação em 4.000  $\times g$  por 5 min em temperatura ambiente. 75 µl de 50% BugBuster (v/v em água) foram adicionados a cada cavidade e células foram suspensas com o uso de agitador de placa. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 min. Uma alíquota (15 a 25 µl dependendo da atividade esperada) de lisato de célula foi transferida para cada cavidade de placas de ensaio de 96 cavidades, que contém 120 µl do tampão de reação e 20 µl de NADH (2,0 mM) por cavidade. Absorbância em 340 nm foi relatada como base, 16 µl de acetolactato (4,5 mM, diluídos com o tampão de reação) foram adicionados a cada cavidade e misturados com agitação pelo leitor de placa. Absorbância em 340 nm foi relatada em 0, e 5 a 10 minutos dependendo da atividade esperada após adição de substrato. A diferença de absorbância (antes e após adição de substrato) foi usada para determinar a atividade dos mutantes. Mutantes com atividade de KARI maior comparados ao controle positivo foram selecionados para caracterização adicional.

#### **MEDIÇÃO DE CONSTANTES DE MICHAELIS DE NADH E NADPH**

[0371] Atividade de enzima KARI pode ser medida de modo rotineiro por oxidação de ADH ou NADPH conforme descrito acima, entretanto, para medir a constante de Michaelis ( $K_M$ ) para essa formação de nucleotídeos de piridina do produto de 2,3-dihidroxiisovalerato foi medida diretamente com o uso de HPLC/MS.

[0372] Concentração de proteína de extrato de célula bruto de células lisadas de Bugbuster (conforme descrito acima) foi medida com o uso do reagente de ensaio de proteína de BioRad (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547). Entre 0,2 e 1,0 microgramas de proteína de extrato bruto foi adicionada a um tampão de reação que consiste em MOPS KOH 100 mM, pH 6,8,  $MgCl_2$  10 mM, EDTA 1 mM, de glicose-6-fosfato 1 mM (Sigma-Aldrich),

0,2 unidade de desidrogenase de glicose-6-fosfato de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma-Aldrich), e várias concentrações de NADH ou NADPH, a um volume de 90 µL. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de [S]-acetolactato em uma concentração final de 2,5 mM e um volume final de 100 µL. Após incubações de 10 min em 30°C, a reação foi resfriada bruscamente retirando-se 50 µL da mistura de reação e adicionando-se os mesmos a 150 µL de 0,1% de ácido fórmico. Para medir o  $K_M$  de NADH e NADPH, as concentrações usadas foram 0,0003, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 e 1 mM.

[0373] Para analisar 2,3-dihidroxiisovalerato, 2 µL da mistura de reação resfriada bruscamente por ácido fórmico foram injetadas em um Waters Acquity HPLC equipado com espectrômetro de massa de Waters SQD (Waters Corporation, Milford, MA). As condições de cromatografia eram: taxa de fluxo (0,5 ml/min), em uma coluna de Waters Acquity HSS T3 (2,1 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento). Tampão A consistia em 0,1% (v/v) em água, Tampão B de 0,1% ácido fórmico em acetonitrila. A amostra foi analisada com o uso de 1% de tampão B (em tampão A) por 1 min, seguido por uma gradiente linear de 1% de tampão B em 1 min para 75% de tampão B em 1,5 min. O produto de reação, 2,3-dihidroxiisovalerato, foi detectado por ionização em  $m/z=133$ , com o uso de ionização por eletropulverização -30 V tensão de cone. A quantidade de produto 2,3- dihidroxiisovalerato, foi calculada por comparação a um padrão autêntico.

[0374] Para calcular o  $K_M$  para NADH e NADPH, os dados de taxa para formação de DHIV medidos em ensaios em uma concentração fixa de S-acetolactato (2,5 mM) foi ajustado à equação de Michaelis-Menten substrato única, com o uso de uma regressão por quadrados mínimos em Microsoft Excel, assumindo saturar a concentração de acetolactato.

#### **CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PYZ058, PLH550. PLH556, E PLH702**

[0375] pY2058 (KARI de pHR81-P<sub>Cup1</sub>-AlsS-P<sub>ILV5</sub>-levedura; SEQ ID NO: 176) foi derivado de pYZ090 (KARI de pHR81-P<sub>Cup1</sub>-AlsS-P<sub>ILV5</sub>-lactis; SEQ

ID NO: 195). pYZ090 foi cortado com enzimas PmeI e SfiI, e ligado com produto de PCR de KARI de levedura. O produto de PCR foi amplificado de DNA genômico de cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Research Genetics Inc.) com o uso de iniciador superior 5'-catcatcacagtttaaacagtatgttgaagcaaatcaacttcggtgg-3' (SEQ ID NO: 272) e iniciador inferior 5'-ggacggggccctgcaggccttattggtttctggtctcaactttctgac-3' (SEQ ID NO: 273), e digerido com enzimas PmeI e SfiI. pYZ058 foi confirmado por sequenciamento.

[0376]pLH550 (pHR81-PCUP1-AlsS-PILV5-Pf5.KARI, SEQ ID NO: 175) foi derivado de pYZ058 (SEQ ID NO: 176). O gene Pf5.KARI de tipo selvagem foi amplificado por PCR com OT1349 (5'-catcatcacagtttaaacagtatgaaagttttctacgataaagactgcgacc-3'; SEQ ID NO: 177) e OT1318 (5'-gcacttgataggcctgcagggccttagttcttggcttgtcgacgattttg-3'; SEQ ID NO: 178), digerido com enzimas PmeI e SfiI e ligado com corte de vetor de pYZ058 com PmeI e SfiI. O vetor gerado, pLH550, foi confirmado por sequenciamento.

[0377]pLH556 (SEQ ID NO: 138; FIGURA 4) foi derivado de pLH550 digerindo-se o vetor com enzimas SpeI e NotI, e ligando-se com um ligante recozido de OT1383 (5'-ctagtcaccggtggc-3', SEQ ID NO: 179) e OT1384 (5'-ggccgccaccggtga-3', SEQ ID NO: 180) que contêm sequências protuberantes para sítios de SpeI e NotI. Essa etapa de clonagem elimina o gene AlsS e um grande fragmento do promotor de PCUP1, com 160 bp de sequência a montante residual que não é funcional. pLH556 foi confirmado por sequenciamento.

[0378]pHR81::ILV5p-K9D3 (pLH702, SEQ ID NO: 181) foi derivado de pLH556. O gene de KARI mutante de K9D3 foi excisado de vetor pBAD-K9D3 com o uso de enzimas PmeI e SfiI, e ligado com pLH556 em sítios de PmeI e SfiI, que substitui o gene Pf5.KARI com o gene K9D3. O vetor construído foi confirmado por sequenciamento.



**EXEMPLO 1****CONSTRUÇÃO DE CEPAS DE VIA DE ISOBUTANOL DE LEVEDURA QUE CONTÊM VÁRIOS****GENES DE KARI**

[0379] Para identificar polipeptídeos que têm atividade de KARI e desempenho em produção de isobutanol de levedura, triagem de biodiversidade de genes de codificação de KARI de várias espécies bacterianas e fúngicas foi executada. Os genes de KARI foram otimizados por códon com base em preferências de códon de genes de *Saccharomyces cerevisiae* foram indicados na Tabela 10. Para cada gene de KARI, um sítio de restrição de PmeI e 3 bp (AGT) adicionais foram adicionados à terminação 5' com a sequência 5'-GTTTAAACAGT-3' (SEQ ID NO: 136) antes do códon de início ATG, e um sítio de restrição de SfiI foi adicionado à terminação 3' com a sequência 5'-GGCCCTGCAGGCC-3' (SEQ ID NO: 137). Todos os genes de KARI foram sintetizados por GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ). Cada gene de KARI foi subclonado em vetor pHR81-P<sub>CUP1</sub>-AlsS-P<sub>Ilv5</sub>-Pf5.Ilv5 (SEQ ID NO: 175) por meio dos sítios de PmeI e SfiI (Ilv5 codifica para cetol-ácido redutoisomerase de levedura). Esse vetor contém dois cassetes de expressão: gene de acetolactato sintase (AlsS) de *Bacillus subtilis* sob o promotor de CUP1 de levedura, e gene Ilv5 de levedura controlador pelo promotor de Ilv5. Análise de sequência foi realizada para confirmar as sequências de gene de KARI.

[0380] Os vetores de KARI de pHR81-PCUP1-AlsS-PI<sub>lv5</sub> que carregam os genes de KARI foram co-transformados com pLH468 (pRS423-P<sub>FBA1</sub>-DHAD- P<sub>TDH3</sub>-kivD-P<sub>GPM1</sub>-hADH1; SEQ ID NO: 139) na cepa hospedeira BP1 135 (PNY1505; Exemplo 8) (CEN.pk 113-7D delta ura3::loxP delta his3 delta pdc6 delta pdc1::ilvD.Sm delta pdc5::sadB delta gpd2::loxP delta fra2). Os transformantes de levedura foram selecionados em placas de meio de retirada mínima (SE-Ura- His, 2% de etanol) após 5 a 7 dias em 30 °C, e rerriscados em

SE-Ura-His para obter remendos de célula após incubação de 3 dias adicional. Os remendos de célula foram usados para agitar inoculação de frasco.

## **EXEMPLO 2**

### **TRIAGEM DA COLEÇÃO DE DIVERSIDADE DE KARI PARA PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL**

[0381] Os vários genes de KARI foram avaliados com base em suas "produtividades eficazes" em levedura. A produtividade eficaz foi determinada após certo período de crescimento sob condições progressivamente limitadas de oxigênio (por exemplo, 48 h). A biomassa de levedura foi calculada com a suposição de que 1 OD<sub>6DO</sub> de células de levedura é equivalente a 0,3 g/L.

[0382] As cepas de via de isobutanol de levedura que carregam vários genes de KARI foram inoculadas em 10 mL de meio de SEG-Ura,His com 0,2% de glicose e 0,2% de etanol, e cultivo de modo aeróbico ao longo da noite em 30°C, a cerca de 2 OD. As culturas foram centrifugadas e uma porção das células foram suspensas em SEG-Ura,His (2% de glicose, 1% de etanol) para um OD<sub>6DO</sub> inicial de 0,4 em 25 mL de volume total em um 125 mL de frasco de agitação. Os frascos de agitação foram fechados com uma tampa plastídea sólida de atarraxar, e as culturas foram cultivadas sob condições progressivamente limitadas de oxigênio no frasco sob troca de ar e oxigênio mínima com o ambiente externo. Após incubação de 48 h em 30°C, 250 RPM, as culturas foram removidas para medição de OD<sub>6DO</sub> e análise de HPLC para medir produção de isobutanol.

[0383] Dos genes de KARI submetidos a triagem, conforme mostrado abaixo, múltiplos tiveram titulações de isobutanol comparável ou melhor que KARI de *Lactococcus lactis*. Em particular, o clone de KARI K9 (*Anaerostipes caccae* DSM 14662) apresentou uma tritagem de isobutanol alta e produtividade de isobutanol eficaz, conforme medido após 48 h de

crescimento sob condições progressivamente limitadas de oxigênio (Tabela 10).

**TABELA 10. TITULAÇÕES DE ISOBUTANOL E PRODUTIVIDADES EFICAZES DE CEPAS DE PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL DE LEVEDURA QUE CARREGAM VÁRIOS GENES DE KARI MEDIDOS APÓS 48 H DE CRESCIMENTO SOB CONDIÇÕES PROGRESSIVAMENTE LIMITADAS DE OXIGÊNIO EM FRASCOS DE AGITAÇÃO EM 30 °C.**

Clone de KARI	SEQ ID NO: (ácido nucleico) * seqs de ácido nucleico de All exceto LTS e S2 são otimizadas por códon	Tritagem de isobutanol (g/L)	Produtividade de isobutanol eficaz (g/g)	Organismo fonte
B3K01 ("K1")	140, 141	2,6	4,1	<i>Bifidobacterium angulatum</i> DSM 20098
B3K02("K2")	142, 143	3,5	3,7	<i>Bifidobacterium dentium</i> ATCC 27678
B3K09 ("K9")	26, 27	4,3	5,2	<i>Anaerostipes caccae</i> DSM 14662
B3K25("K25")	375, 376	3,6	4,4	<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2
B3K26 ("K26")	381, 382	4,4	3,2	<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9
B3K29 ("K29")	377, 378	4,1	3,3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. cremoris MG1363
LTS	379, 380	2,7	3,1	<i>Lactococcus lactis</i>
B3K07 ("K7")	274, 275	3,7	2,8	<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052
S2	276, 277	3,6	1,5	<i>Zymomonas mobilis</i>

### **EXEMPLO 3**

#### **ANÁLISE DE ENZIMA KARI DAS CEPAS DE VIA DE ISOBUTANOL DE LEVEDURA**

[0384] IpOHA (ácido N-isopropil oxalilhidroxâmico) é um imitador de um intermediário de reação para a reação catalisada pela enzima KARI. É um inibidor de ligação forte que se liga ao sítio ativo da enzima KARI. A síntese de IpOHA e sua ligação forte a KARI de *E. coli* é descrita em literatura (A. Aulabaugh e J. V. Schloss, Biochemistry, 1990, 29, 2824 a 2830). Seu uso para

titulação em sítio ativo não foi relatado anteriormente. IpOHA foi sintetizado de [ $^{14}\text{C}$ ]-oxalato de acordo com literatura.

[0385]As culturas de levedura do Exemplo 2 foram colhidas e analisadas para atividades de enzima KARI. 25 mL das culturas foram peletizados e resuspensores em 10 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As células foram centrifugadas novamente para remover o tampão e as péletes de célula são armazenadas em - 70°C. As péletes de célula foram resuspensores em 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e sonicadas. Extratos de célula brutos solúveis foram usados para realizar os ensaios de enzima. Uma porção de enzima foi incubada com um excesso molar de [ $^{14}\text{C}$ ]-IpOHA, e concentrações de saturação de NAD(P)H e  $\text{Mg}^{2+}$ . Pelo fato de que um complexo sensível a diluição, reversível, se forma primeiro, concentrações de extrato foram mantidas altas, para favorecer complexação e reduzir, assim, o tempo necessário para formação complexa forte. Pelo fato de que não foi conhecido *a priori* quanto tempo precisaria para cada KARI formar o complexo forte, dois pontos de tempo foram tomados para cada amostra para verificar que os resultados confirmam. No término do tempo de incubação, pequenas moléculas foram separadas de moléculas de proteína por ultrafiltração com o uso de Microcon® (Millipore Inc., Billerica, MA), e a fração de peso molecular alta foi contada. A concentração de KARI na amostra em  $\mu\text{M}$  ou  $\text{mg/ml}$  foi recalculada a partir do  $^{14}\text{C}$  dpm, dos volumes, e do peso molecular de subunidade de KARI. Um ensaio de enzima de tempo fixo foi executado concorrentemente, e os dados foram usados para calcular U/ml. A atividade específica foi calculada dividindo-se U/ml por  $\text{mg/ml}$  para uma amostra proporcionada. A suposição feita era que atividade completa e a habilidade para ligar IpOHA são estritamente correlacionadas. As atividades específicas das enzimas de KARI assim medidas são listadas na Tabela 11. A atividade de KARI em "Unidades por

mg" representa a atividade por miligrama de enzima KARI como quantificado com o uso do ensaio de IpOHA. Concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford, e o nível de expressão de KARI é calculado dividindo-se quantidade de enzima KARI pela quantidade de proteínas celulares solúveis totais.

**TABELA 11. ATIVIDADES DE ENZIMA KARI MEDIDA PELO ENSAIO DE IPOHA**

Clone de KARI	Atividade de KARI U/mg	% de proteína total de KARI	Organismo
B3K01 ("K1")	0,56	21	<i>Bifidobacterium angulatum</i> DSM 20098
B3K02("K2")	0,44	28	<i>Bifidobacterium dentium</i> ATCC 27678
B3K09 ("K9")	2,4	15	<i>Anaerostipes caccae</i> DSM 14662
B3K25("K25")	1,3	21	<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2
B3K26 ("K26")	1,5	17	<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9
B3K29 ("K29")	1,6	14	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. cremoris MG1363
LTS	0,8	23,0	<i>Lactococcus lactis</i>

#### **EXEMPLO 4**

#### **CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE GENE DE SATURAÇÃO DE SÍTIO PARA IDENTIFICAR VARIANTES COM O USO DE NADH COM $K_m$ MENOR QUE DO TIPO**

#### **SELVAGEM**

[0386] Para construir o vetor de expressão bacteriana com base em pBAD para KARI DE K9, o gene de KARI de K9 (sintetizado por Genscript, Piscataway, NJ) foi subclonado em vetor pBAD-ps-JEA1 (SEQ ID NO: 905) por meio dos sítios de PmeI e SfiI. A cetol-ácido redutoisomerase (KARI) de *Anaerostipes caccae* (chamado de KARI de K9) foi usado para a construção de biblioteca. Uma biblioteca de gene foi construída com o uso dos kits comercialmente disponíveis, polinucleotídeo quinase de T4 (PNK) (USB Corporation, Cleveland, Ohio, n° 70031 Z) e ChangJT Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (USB Corporation, Cleveland, Ohio, n° 78480).

[0387] Os oligonucleotídeos (K9\_56\_58\_060210f: GAAGGANNKAAANNKTGGAAGAGAGC, SEQ ID NO. 144; e K9\_56\_58\_060210r: GCTCTCTTCCAMNNTTTMNNTCCTTC, SEQ ID NO: 145) foram sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville IA). Os mesmos eram primeiramente fosforilados por T4 PNK. Em curta, uma mistura de reação de 30 µl continha: 3,0 µl de tampão de 10x T4 PNK suprido com o kit, 4,0 µl de iniciador (cerca de 35 µM), 0,8 µl de mistura de ATP 100 mM, 0,6 µl de T4 PNK e 22 µl de água. A mistura de reação foi incubada em 37°C por 1,0 hr e T4 PNK foi, então, desativado em 65°C por 20 min.

[0388] Os Iniciadores fosforilados foram diretamente usados, então, para a reação de PCR subsequente para introduzir as mutações em dois sítios em tipo selvagem de KARI de K9 com o uso do kit. Em curta, uma mistura de reação de 30 µl continha: 3,0 µl de tampão de reação de 10x suprido com o kit, 3,0 µl de iniciador direto fosforilado e iniciador reverso, 2,0 µl de tipo selvagem de KARI de K9 (50 ng/µl), 1,2 µl de enzima de ChangJT e 17,8 µl de água. Essa mistura de reação foi colocada em tubos de PCR com capacidade para 200 µl de cavidade fina e o programa de reação de PCR a seguir foram usados para o PCR: A temperatura de início era de 95°C por 2 min seguido por 30 ciclos de aquecimento/resfriamento. Cada ciclo consistiu em 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, e 68°C por 20 min. Na conclusão da ciclicização de temperatura, as amostras foram mantidas em 68° C por 25 min adicionais, e, então, mantidas em 4°C para processamento posterior. A reação de PCR foi limpa com o uso do kit de limpeza de DNA de Zymo (Zymo Research Corporation, Orange CA, #D4004). DNA foi eluído para fora de membrana com o uso de 84 µl de água. O modelo de DNA foi removido com Dpn I (Promega, Madison WI, #R6231) em 37°C por 3 hr (mistura de reação: 10 µl de tampão de reação de 10x, 1,0 µl de BSA, 6,0 µl de Dpn I e 83 µl de DNA de PCR limpo). O DNA digerido por Dpn I foi limpo novamente com kit de

limpeza de DNA de Zymo e digerido novamente com Dpn I para remover completamente o modelo de DNA (mistura de reação: 1,5 µl de tampão de reação de 10x, 0,15 µl de BSA, 0,85 µl de Dpn I e 83 µl de DNA de PCR limpo). A mistura de reação foi diretamente usada para transformar uma cepa de eletrocomponente de *E. coli* Bw25113( $\Delta ilvC$ ) (descrito na Patente nº. U.S. 8.129.162, que é incorporada no presente documento por referência em sua totalidade) com o uso de um BioRad Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Os clones transformados foram riscados em placas de ágar que contêm o meio de LB e 100 µg/ml de ampicilina (Cat#L1004, Teknova Inc. Hollister, CA) e incubados em 37°C ao longo da noite. Clones foram submetidos a triagem para atividade com o uso de NADH. K para as variantes foi medido (Tabela 12).

**TABELA 12**

[0389] Valores cinéticos para variantes de KARI de K9 em extratos de *E. coli*, conforme determinado por meio de ensaios de formação de DHIV

Mutante	SEQ ID NO: (ácido nucleico, aminoácido)	Mutações	K <sub>M</sub> (µM) (NADH)	K <sub>M</sub> (µM) (NADPH)
K9 Wt	26, 27		326	0,2
AB1D1	28, 29	S56A	164	1
495B5	30, 31	S56A/S58H	44	4
AB1D3 (também referido como "K9D3")	32, 33	S56A/S58d	38	9
AB1G9 (também referido como "K9G9")	34, 35	S56AS58E	47	23

**EXEMPLO 5**

Construção de bibliotecas de gene de saturação de sítio para reduzir K<sub>M</sub> para NADH

[0390] Com base no trabalho com KARI de *Pseudomonas fluorescens* (KARI de PF5) posições 24, 33, 61, 80, 156 e 170 foram alvejadas como alvos de mutagênese para KARI de K9. Através de alinhamento de

sequência múltipla (MSA) entre KARI de PF5 e KARI de K9 (Figura 2), as posições correspondentes são 30, 39, 67, 86, 162, e 176.

[0391] Para identificar mais alvos de mutagênese, MSA de enzimas de KARI existentes (K1, K2, K7, K9, K25, K26, *L. Lactis* e S2), determinados para produzir isobutanol em uma cepa de butanologen (ver outros exemplos) foi usado para identificar mais alvos de mutagênese. Posições 41, 87, 131, 191, 227, e 246 foram selecionadas como alvos de mutagênese.

[0392] As posições de alvejamento de oligonucleotídeos 30, 39, 41, 67, 86, 87, 131, 162, 176, 191, 227, e 246 foram comercialmente sintetizadas por Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville IA) (Tabela 13). Oito pares de posições de alvo de oligonucleotídeos 30, 67, 131, 162, 176, 191, 227, e 246 foram usados para gerar Megalnciadores com o uso de Supermix de Invitrogen (Cat#10572-014, Invitrogen, Carlsbad, CA). Para cada reação de PCR, um par de Iniciadores, qualquer combinação de um iniciador direto e um iniciador reverso que codifica posições diferentes daqueles oito pares de oligonucleotídeos (por exemplo, K9\_30\_1011 10f e K9\_67\_101110r), foi usado. Há no total  $\rho_8^2$  ou 56 combinações. Uma mistura de reação de 25 µl continha: 22,5 µl de solução de Supermix, 1,0 µl de iniciador direto e 1,0 µl de iniciador reverso, 0,5 µl de modelo de DNA AB1 D3 (50 ng/µl). A mistura foi colocada em um tubo de 200 µl de cavidade fina para a reação de PCR em um equipamento de gradiente de Mastercycler (Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY). As condições a seguir foram usadas para a reação de PCR: A temperatura de início era de 95°C por 1,0 min seguido por 35 ciclos de aquecimento/resfriamento. Cada ciclo consistia em 95°C por 20 seg, 55°C por 20 seg, e 72°C por 1,0 min. Na conclusão da ciclização de temperatura, as amostras foram mantidas em 72° C por 2,0 min adicionais, e, então, mantidas aguardando recuperação de amostra em 4°C. O produto de PCR foi limpo com o



uso de um kit de limpeza de DNA (N° cat D4003, Zymo Research, Orange, CA) conforme recomendado pelo fabricante.

[0393] Os Megainiciadores foram usados, então, para gerar bibliotecas de gene com o uso do kit de mutagênese direcionada por sítio de QuickChange II XL (Catálogo n° 200524, Stratagene, La Jolla CA). Uma mistura de reação de 25 µl continha: 2,5 µl de tampão de reação de 10x, 1,0 µl de 50 ng/µl de modelo, 20,5 µl de Megainiciador, 0,5 µl de mistura de dNTP 40 mM, 0,5 µl de pfu-ultra DNA polimerase. Exceto pelo Megainiciador e os modelos, todos os reagentes usados aqui foram supridos com o kit indicado acima. Essa mistura de reação foi colocada em um tubo de PCR de capacidade para 200 µl de cavidade fina e as reações a seguir foram usadas para o PCR: A temperatura de início era de 95°C por 30 seg seguida por 25 ciclos de aquecimento/resfriamento. Cada ciclo consistiu em 95°C por 30 seg, 55°C por 1 min, e 68°C por 6 min. Na conclusão da ciclização de temperatura, as amostras foram mantidas em 68° C por 8 min adicionais, e, então, mantida em 4°C para processamento posterior. A mistura de reação de PCR foi processada com enzima de restrição de Dpn I igual a aquela usada no Exemplo 4.

[0394] Os oligonucleotídeos K9\_37&39\_101110f, K9\_37&39\_101110r e K9\_86&87\_101110f, K9\_86&87\_101110r foram diretamente usados, então, para gerar bibliotecas de gene com o uso do kit de mutagênese direcionada por sítio de QuickChange II XL. Duas misturas de reação de 25 µl para os dois conjuntos de oligonucleotídeo, cada mistura de reação de 25 µl continha: 2,5 µl de tampão de reação de 10x, 1,0 µl de 50 ng/µl de modelo, 1,0 µl de iniciador direto, 1,0 µl de iniciador reverso, 0,5 µl de mistura de dNTP 40 mM, 0,5 µl de pfu-ultra DNA polimerase e 18,5 µl de água. O programa de PCR e o processamento de Dpn I subsequente são os mesmos.

[0395] A mistura de DNA processada por Dpn I foi limpa com o uso de kit de limpeza de DNA de Zymo seguindo o protocolo do fabricante. O DNA limpo foi usado para transformar uma cepa de eletrocomponente de *E. coli* 10 Bw25113 ( $\Delta ilvC$ ) com o uso de um BioRad Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Os clones transformados foram riscados em placas de ágar que contêm o meio de LB e 100 µg/ml de ampicilina (Cat#L1004, Teknova Inc. Hollister, CA) e incubados em 37°C ao longo da noite. Clones foram submetidos a triagem para atividade aprimorada com o uso de NADH.  $K_M$  para os mutantes aprimorados foi medido (Tabela 14).

**TABELA 13: INICIADORES**

Posição(ões) alvejada(s) de <i>KARI de K9</i>	Iniciadores
30	K9_30_101110f: gactatcgccggttatcggtNNKgggtctcaaggtcac SEQ ID NO: 146 K9_30_101110r: GTGACCTTGAGAACCMNNACCGATAACGGCGATAGTC SEQ ID NO: 147
67	K9_67_101110f: gagctgaagaacaaggtNNKgaagtctacaccgctgc SEQ ID NO: 148 K9_67_101110r: GCAGCGGTGTAGACTTCMNNACCTTGTTCTTCAGCTC SEQ ID NO: 149
131	K9_131_101110f: caaaggacggtgatgtcNNKatgatcgctccaaag SEQ ID NO: 150 K9_131_101110r: CTTTGGAGCGATCATMNNGACATCAACGTCCTTT SEQ ID NO: 151
162	K9_162_101110f: gctgtcgaacaagacNNKactggcaaggcttg SEQ ID NO: 152 K9_162_101110r: CAAAGCCTTGCCAGTMNNGTCTTGTTTCGACAGC SEQ ID NO: 153
176	K9_176_101110f: gctttggcctacgcttaNNKatcggtggtgctagagc SEQ ID NO: 154 K9_176_101110r: GCTCTAGCACCACCGATMNNNTAAAGCGTAGGCCAAAGC SEQ ID NO: 155
191	K9_191_101110f: gaaactaccttcagaNNKgaaactgaaaccgac SEQ ID NO: 156 K9_191_101110r: GTCGGTTTCAGTTTCMNNNTCTGAAGGTAGTTC SEQ ID NO: 157
227	K9_227_101110f: gccggttacgacccaNNKaacgcttactcgaatg SEQ ID NO: 158 K9_227_101110r: CATTGGAAGTAAGCGTTMNNNTGGGTCGTAACCGGC SEQ ID NO: 159
246	K9_246_101110f: gttgactgatctacNNKtctggtttctccggtatgc SEQ ID NO: 160 K9_246_101110r: GCATACCGGAGAAACCAGAMNNGTAGATCAAGTCAAC SEQ ID NO: 161
39, 41	K9_37&39_101110f: gttctcaaggtcacgctNNKgccNNKaatgctaaggaatcc SEQ ID NO: 162 K9_37&39_101110r: GGATTCCTTAGCATTMNNNGGCMNNAGCGTGACCTTGAGAAC SEQ ID NO: 163
86, 87	K9_86&87_101110f: gacatcattatgatctgNNKNNKgatgaaaagcaggc SEQ ID NO: 164 K9_86&87_101110r: GCCTGCTTTTCATCMNNMNNCAAGATCATAATGATGTC SEQ ID NO: 165

**TABELA 14**[0396] Lista de alguns mutantes com seus valores de  $K_M$  medidos

Mutante	SEQ ID NO: (ácido nucleico, aminoácido)	Mutações	$K_M$ ( $\mu$ M) (NADH)	$K_M$ ( $\mu$ M) (NADPH)
AO749	38, 39	S56A/S58D/I86T/N87P	15	7
AO7B5	36, 37	S56A/S58D/I86V/N87P	8	4
AO7H8	40, 41	S56A/S58D/N87P	8	6
AO7D8	42, 43	S56A/S58D/T131C/T191S	26	6
AO7F7	44, 45	S56A/S58D/T131V/T191A	28	7
AO7H7	46, 47	S56A/S58D/T131S	29	8

**EXEMPLO 6****CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA COMBINATÓRIA PARA DIMINUIR  $K_M$  PARA NADH**

[0397] Com base nos resultados de mutagênese (Exemplo 4), T131L, T131A, T131V, T131M, T131C, T191D, T191C, T191S, e T191G são considerados como mutações benéficas para aprimorar  $K_M$  para NADH. Uma biblioteca combinatória para introduzir essas mutações benéficas em AO7B5 foi feita.

[0398] Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville IA). Os mesmos foram primeiramente fosforilados por T4 PNK. Em curta, uma mistura de reação de 20  $\mu$ l continha: 2,0  $\mu$ l de tampão de 10x T4 PNK suprido com o kit, 2,85  $\mu$ l de iniciador (cerca de 35  $\mu$ M, 0,6  $\mu$ l de mistura de ATP 100 mM, 0,4  $\mu$ l de T4 PNK e 14,15  $\mu$ l de água. A mistura de reação foi incubada em 37°C por 1.0 hr e T4 PNK foi, então, desativado a 65°C por 20 min.

[0399] Os Iniciadores fosforilados foram diretamente usados, então, para a reação de PCR subsequente para introduzir as mutações em dois sítios em AO7B5 com o uso do kit. Em curta, um 50  $\mu$ l mistura de reação continha: 5,0  $\mu$ l de tampão de reação de 10x suprido com o kit, 2,5  $\mu$ l de iniciador direto fosforilado (0,5  $\mu$ l de cada iniciador direto mostrado na Tabela 15), 2,5  $\mu$ l de iniciador reverso (0,625  $\mu$ l de cada iniciador direto mostrado na Tabela 15), 2,5  $\mu$ l de AO7B5 (50 ng/ $\mu$ l), 2,5  $\mu$ l de enzima de

ChangJT e 35 µl de água. Essa mistura de reação foi colocada em tubos de PCR com capacidade para 200 µl de cavidade fina e o programa de reação de PCR a seguir foram usados para o PCR: A temperatura de início era de 95°C por 2 min seguida por 30 ciclos de aquecimento/resfriamento. Cada ciclo consistia em 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, e 68°C por 20 min. Na conclusão da ciclização de temperatura, as amostras foram mantidas em 68° C por 25 min adicionais, e, então, mantidas em 4°C para processamento posterior. A reação de PCR foi limpa com o uso do kit de limpeza de DNA de Zymo (Zymo Research Corporation, Orange CA, #D4004). DNA foi eluído para fora de membrana com o uso de 84 µl de água. O modelo de DNA foi removido com Dpn I (Promega, Madison WI, nº R6231) em 37°C por 3 hr (mistura de reação: 10 µl de tampão de reação de 10x, 1,0 µl BSA, 6,0 µl de Dpn I e 83 µl de DNA de PCR limpo). O DNA digerido por Dpn I foi limpo novamente com kit de limpeza de DNA de Zymo e digerido novamente com Dpn I para remover completamente o modelo de DNA (mistura de reação: 1,5 µl de tampão de reação de 10x, 0,15 µl de BSA, 0,85 µl de Dpn I e 83 µl de DNA de PCR limpo).

[0400]A mistura de DNA processada por foi limpa com o uso de kit de limpeza de DNA de Zymo seguindo o protocolo do fabricante. O DNA limpo foi usado para transformar uma cepa de eletrocomponente de *E. coli* Bw25113 ( $\Delta ilvC$ ) com o uso de um BioRad Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Os clones transformados foram riscados em placas de ágar que contêm o meio de LB e 100 µg/ml de ampicilina (Cat#L1004, Teknova Inc. Hollister, CA) e incubados em 37°C ao longo da noite. Clones foram submetidos a triagem para atividade aprimorada com o uso de NADH.  $K_M$  para os mutantes aprimorados foi medido (Tabela 16).

**TABELA 15. INICIADORES PARA EXEMPLO 6**

Posição(ões) alvejadas de KARI de K9	Iniciadores
131	K9_131L_112210f: ggacgttgatgtcTTGatgatcgctcc SEQ ID NO: 166 K9_131A_112210f: ggacgttgatgtcGCAatgatcgctcc SEQ ID NO: 167 K9_131 V_112210f: ggacgttgatgtcGTTatgatcgctcc SEQ ID NO: 168 K9_131 M_112210f: ggacgttgatgtcATGatgatcgctcc SEQ ID NO: 169 K9_131 C_112210f: ggacgttgatgtcTGAatgatcgctcc SEQ ID NO: 170
191	K9_191D_112210r: GGTTCAGTTTCGTCTCTGAAGGTAGTTTC SEQ ID NO: 171 K9_191C_112210r: GGTTCAGTTTCGCATCTGAAGGTAGTTTC SEQ ID NO: 172 K9_191S_112210r: GGTTCAGTTTCGATCTGAAGGTAGTTTC SEQ ID NO: 173 K9_191G_112210r: GGTTCAGTTTCGCCTCTGAAGGTAGTTTC SEQ ID NO: 174

**TABELA 16**

[0401] Lista de alguns mutantes com seus valores de  $K_M$  medidos

Mutante	SEQ ID NO: (ácido nucleico, aminoácido)	Mutações	$K_M$ ( $\mu$ M) (NADH)	$K_M$ ( $\mu$ M) (NADPH)
AWB9	52, 53	S56A/S58D/I86V/N87P/T131A	10	4
AWC1	54, 55	S56A/S58D/I86V/N87P/T131V	9	3
AWD6	62, 63	S56A/S58D/I86V/N87P/T131V/T191S	5	2
AWD10	64, 65	S56A/S58D/I86V/N87P/T131A/T191C	8	3
AWF4	56, 57	S56A/S58D/I86V/N87P/N107S/T131V	7	3
AWF6	58, 59	S56A/S58D/I86V/N87P/T131V/T191D	7	2
AWG4	60, 61	S56A/S58D/I86V/N87P/T131V/T191G	6	2
AS6F1	48, 49	S56A/S58D/I86V/N87P/T131M/T191G	4	1

**EXEMPLO 7****PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL A PARTIR DE VARIAÇÕES DE KARI DE K9**

[0402] As variantes a seguir de KARI de K9 foram geradas conforme descrito acima.

**TABELA 17****AS VARIANTES DE KARI E OS VETORES DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA****CORRESPONDENTES**

Nomes de clone	Nome de vetor de levedura	Localizações de mutação de ponto de nucleotídeo					Posições de mutação de aminoácido
		166	168	172	173	174	
KARI de WT K9	PHR81- Pllv5- KARI-K9	T	T	T	C	C	S56, S58
AB1G9	PHR81- Pllv5- KARI-K9. G9	G	G	G	A	G	S56A, S58E
495B5	PHR81- Pllv5-	G	T	C	A	T	S56A, S58H

Nomes de clone	Nome de vetor de levedura	Localizações de mutação de ponto de nucleotídeo					Posições de mutação de aminoácido
		166	168	172	173	174	
	KARI-K9. B5						
AB1D3	PHR81-Pilv5-KARI-K9. D3	G	T	G	A	T	S56A, S58D
AB1D1	PHR81-Pilv5-KARI-K9. D1	G	T	T	C	C	S56A

[0403] Os plasmídeos de expressão de levedura foram feitos por subclonagem dos genes de KARI variantes de vetores de *E.coli* (pBAD.KARI) em vetor pLH556 de pHR81-Pilv5-Pf5.KARI (Figura 4, SEQ ID NO: 138) em sítios de PmeI e SfiI. Cepas de via de levedura foram feitas em hospedeiro PNY2204 (MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t-pUC19-loxP-kanMX-loxP-P[FBA1]-ALS|alsS\_Bs-CYC1tpdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB\_Ax-PDC5tgpd2Δ::loxPfra2Δadh1Δ::UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_LI(y)-ADH1t; Exemplo 13) cotransformando-se os vetores de KARI como plasmídeo de via #1, e pBP915 (pRS423-P<sub>FBA1</sub>-DHAD-P<sub>GPM1</sub>-hADH1 ; SEQ ID NO: 182) como plasmídeo de via #2. Transformantes foram remendados para o mesmo meio que contém 2% de glicose e 0,1% de etanol como fontes de carbono. Três remendos foram testados para produção de isobutanol sob condições microaeróbicas em recipientes de soro. Um clone que foi transformado com pBP915 e o plasmídeo pLH702 que expressa K9D3 foi designado PNY1910.

[0404] Colônias de levedura da transformação em placas de SE-Ura-His apareceram após 5 a 7 dias. As colônias foram remendadas em placas de SE-Ura-His extemporâneas, incubadas em 30°C por 3 dias. As células remendadas foram inoculadas em 25 mL de meio de SEG-Ura,His com 0,2% de glicose e 0,2% de etanol e cultivadas aerobicamente por 1 a 2 dias em 30°C, para 2 a 3 OD. As células foram centrifugadas e resuspensas em 1 mL de meio de SEG-Ura,His (2% de glicose, 0,1% de etanol, 10 mg/L de

ergosterol, MES 50 mM, pH 5,5, 30 mg/L de tiamina, 30 mg/L de ácido nicotínico). Uma quantidade calculada de células foi transferida para 45 mL de volume total do mesmo meio para um OD=0,2 inicial em um recipiente de soro de 60 mL, com o topo fechado fortemente por um amassador. Essa etapa foi concluída na biocapa regular em ar. Os recipientes de soro foram incubados em 30°C, 200 rpm por 2 dias. Em 48 h, as amostras foram removidas para análise de OD e HPLC de glicose, isobutanol e intermediários de via. Amostras de 24 h foram tomadas em uma câmara anaeróbica para manter a condição anaeróbica nos recipientes de soro. Na fase inicial da incubação de 48 h, o ar presente no espaço de cabeçote (~15 mL) e o meio líquido são consumidos pelas células de levedura em crescimento. Após o oxigênio no espaço de cabeçote ser consumido, a cultura se torna anaeróbica. Portanto, esse experimento inclui comutar condições de aeróbica para condições anaeróbicas e limitantes de oxigênio.

[0405] Das quatro variações de K9, AB1G9 e AB1D3 produziram titulações de isobutanol relativamente altas, enquanto 495B5 e AB1D1 tiveram tritagem menor. Cepa de KARI de K9 de tipo selvagem produziu a menor tritagem. Embora sem desejar ser ligado por teoria, é acreditado que a tritagem menor é devido ao equilíbrio deslocado de NADH e NADPH quando células são comutadas de condições aeróbicas para anaeróbica. Por essa análise racional, sob condições anaeróbicas, disponibilidade e concentração de NADH aumentaram significativamente, que favorece as enzimas de KARI variantes que usam NADH. Com base na análise cinética, mutantes de AB1G9 ("K9G9") e AB1D3 ("K9D3") têm  $K_M$  relativamente alto para NADPH (23 & 9,2  $\mu$ M), em adição a seu  $K_M$  relativamente baixo para NADH (47 & 38  $\mu$ M). Como comparação,  $K_M$ s do 495B5 e do AB1D1 são 2,5 e 1,1  $\mu$ M respectivamente para NADPH, e  $K_M$  do wt K9 é 0,10  $\mu$ M. O  $K_M$  de NADH baixo de AB1G9 e de AB1D3, juntamente com o  $K_M$  de NADPH alto de AB1G9 e AB1D3 podem ter

levado a utilização de NADPH reduzida sob condições anaeróbicas, e utilização de NADH relativamente alta. Como evidência, AB1G9 e AB1 D3 têm acumulação de glicerol menor (isobutanol:glicerol = 3,3) comparado a 495B5 e AB1D1 (2 a 3). A relação de isobutanol:glicerol é para o tipo selvagem, K9 é 1:1 sob a mesma condição de aeróbica para anaeróbica comutada.

### **TABELA 18**

[0406] Propriedades cinéticas de K9 enzimas de KARI de K9 de tipo selvagem e variantes, e tritagem de isobutanol e produtividade medida de experimento de comutação de aeróbico para anaeróbico em recipientes de soro.

Nomes de clone	K <sub>M</sub> (NADPH)	V <sub>max</sub> de NADPH (U/mg)	K <sub>M</sub> (NADH)	V <sub>max</sub> de NADH (U/mg)	Isobutanol g/L	Produtividade de isobutanol eficaz (g/g de células)
KARI DE WT K9	0,19	2,0	326	1,5	0,9	3,1
AB1G9	23	2,4	47	2,0	3,4	10,5
495B5	3,5	2,5	44	1,9	2,2	9,2
AB1D3	9,2	2,1	38	1,9	3,3	10,8
AB1D1	1,1	2,8	164	2,1	2,3	9,5

### **EXEMPLO 8**

#### **CONSTRUÇÃO DE CEPAS BP1135 (PNY1505) E PNY1507 DE *SACCHAROMYCES***

#### ***CEREVISIAE* E DERIVADOS PRODUTORES DE ISOBUTANOL**

[0407] Esse exemplo descreve construção de cepas BP1135 e PNY1507 de *Saccharomyces cerevisiae*. Essas cepas foram derivadas de PNY1503 (BP1064). PNY1503 foi derivado de CEN.PK 113-7D (CBS 8340; Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, Holanda). BP1135 contém uma deleção adicional do gene *FRA2*. PNY1507 foi derivado de BP1135 com deleção adicional do gene *ADH1*, com integração do gene *kivD* de *Lactococcus lactis*, otimizado em códon para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, no local de *ADH1*.

[0408] Deleções/integrações foram criadas por recombinação homóloga com fragmentos de PCR que contêm regiões de homologia a



montante e a jusante do gene alvo e o gene *URA3* para seleção de transformantes. O gene *URA3* foi removido por recombinação homóloga para criar uma deleção/integração sem marca.

[0409] O procedimento de deleção/integração sem marca foi adaptado de Akada *et al.*, *Yeast*, 23:399, 2006. Em geral, O cassete de PCR para cada deleção/integração foi feito combinando-se quatro fragmentos, A-B-U-C, e o gene a ser integrado clonando-se os fragmentos individuais em um plasmídeo antes de o cassete inteiro ser amplificado por PCR para o procedimento de deleção/integração. O gene a ser integrado foi incluído no cassete entre fragmentos A e B. O cassete de PCR continha um carreador selecionável/contrasselecionável, *URA3* (Fragmento U), que consiste no gene CEN.PK 113-7D *URA3* nativo, junto com o promotor (250 bp a montante do gene *URA3*) e regiões de terminação (150 bp a jusante do gene *URA3*). Fragmentos A e C (cada um com aproximadamente 100 a 500 bp de comprimento) corresponderam às sequências imediatamente a montante da região alvo (Fragmento A) e a 3' sequência da região alvo (Fragmento C). Fragmentos A e C foram usados para integração do cassete no cromossomo por recombinação homóloga. Fragmento B (500 bp de comprimento) correspondeu aos 500 bp imediatamente a jusante da região alvo e foi usado para excisão do marcador de *URA3* e Fragmento C do cromossomo por recombinação homóloga, como uma repetição direta da sequência que corresponde a Fragmento B foi criada mediante integração do cassete no cromossomo.

#### **DELEÇÃO DE *FRA2***

[0410] A deleção de *FRA2* foi projetada para deletar 250 nucleotídeos da 3' terminação da sequência de codificação, que deixa os primeiros 113 nucleotídeos da sequência de codificação de *FRA2* intactos. Um códon de terminação em estrutura estava presente 7 nucleotídeos a jusante da

deleção. Os quatro fragmentos para o cassete de PCR para a deleção de *FRA2* sem marca foram amplificados com o uso de Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs; Ipswich, MA) e DNA genômico de CEN.PK 113-7D como modelo, preparado com um kit de Gentra Puregene Yeast/Bact (Qiagen; Valencia, CA). Fragmento A de *FRA2* foi amplificado com iniciador oBP594 (SEQ ID NO. 183) e iniciador oBP595 (SEQ ID NO: 184), que contém uma 5' extremidade com homologia à 5' terminação de Fragmento B de *FRA2*. Fragmento B de *FRA2* foi amplificado com iniciador oBP596 (SEQ ID NO: 185), que contém uma 5' extremidade com homologia à 3' terminação de Fragmento A de *FRA2*, e iniciador oBP597 (SEQ ID NO: 186), que contém uma 5' extremidade com homologia à 5' terminação de Fragmento U de *FRA2*. Fragmento U de *FRA2* foi amplificado com iniciador oBP598 (SEQ ID NO: 187), que contém uma 5' extremidade com homologia à 3' terminação de Fragmento B de *FRA2*, e iniciador oBP599 (SEQ ID NO: 188), que contém uma 5' extremidade com homologia à 5' terminação de Fragmento C de *FRA2*. Fragmento C de *FRA2* foi amplificado com iniciador oBP600 (SEQ ID NO: 189), que contém uma 5' extremidade com homologia à 3' terminação de Fragmento U de *FRA2*, e iniciador oBP601 (SEQ ID NO: 190). Produtos de PCR foram purificados com um kit de PCR Purification (Qiagen). Fragmento AB de *FRA2* foi criado sobrepondo-se PCR misturando-se Fragmento A de *FRA2* e Fragmento B de *FRA2* e amplificando-se com Iniciadores oBP594 (SEQ ID NO: 183) e OBP597 (SEQ ID NO: 186). Fragmento UC de *FRA2* foi criado sobrepondo-se PCR misturando-se Fragmento U de *FRA2* e Fragmento C de *FRA2* e amplificando-se com Iniciadores oBP598 (SEQ ID NO: 187) e oBP601 (SEQ ID NO: 190). Os produtos de PCR resultantes foram purificados em um gel de agarose seguido por um kit de Gel Extraction (Qiagen). O cassete ABUC de *FRA2* foi criado sobrepondo-se PCR misturando-se Fragmento AB de *FRA2* e Fragmento UC de *FRA2* e amplificando-se com Iniciadores oBP594 (SEQ ID

NO:183 e oBP601 (SEQ ID NO:190). O produto de PCR foi purificado com um kit de PCR Purification (Qiagen).

[0411] Células competentes de PNY1503 foram feitas e transformadas com o cassete de PCR ABUC de FRA2 com o uso de um kit de Frozen-EZ Yeast Transformation II (Zymo Research; Orange, CA). Misturas de transformação foram plaqueadas em meio completo sintético sem uracil complementado com 1% de etanol em 30°C. Transformantes com um nocaute de *fra2* foram submetidos a triagem por PCR com Iniciadores oBP602 (SEQ ID NO: 191) e oBP603 (SEQ ID NO: 192) com o uso de DNA genômico preparado com um kit de Gentra Puregene Yeast/Bact (Qiagen). Um transformante correto foi cultivado em YPE (extrato de levedura, peptona, 1% de etanol) e plaqueado em meio completo sintético que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1%) em 30°C para selecionar isolados que perderam o marcador de URA3. A deleção e remoção de marcador foram confirmadas por PCR com Iniciadores oBP602 (SEQ ID NO:191) e oBP603 (SEQ ID NO:192) com o uso de DNA genômico preparado com um kit de Gentra Puregene Yeast Bact (Qiagen). A ausência do gene *FRA2* do isolado foi demonstrada por um resultado de PCR negativo com o uso de Iniciadores específicos para a sequência de codificação deletada de *FRA2*, oBP605 (SEQ ID NO: 193) e oBP606 (SEQ ID NO: 194). O isolado correto foi selecionado como cepa CEN.PK 113-7D MATa *ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t pdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB\_Ax-PDC5t gpd2Δ::loxP fra2Δ* e designado como PNY1505 (BP1135).

[0412] Essa cepa foi transformada com plasmídeos de via de isobutanol (pYZ090, SEQ ID NO. 195) e pLH468 (SEQ ID NO. 139), e um clone foi designado BP1 168 (PNY1506).

[0413] pYZ090 (SEQ ID NO: 195) foi construído para conter um gene quimérico que tem a região de codificação do gene *alsS* de *Bacillus subtilis* (posição nt 457-2172) expresso do promotor CUP1 de levedura (nt 2-

449) e seguido pela terminação CYC1 (nt 2181-2430) para expressão de ALS, e um gene quimérico que tem a região de codificação do gene *ilvC* de *Lactococcus lactis* (nt 3634-4656) expresso do promotor ILV5 de levedura (2433-3626) e seguido pela terminação ILV5 (nt 4682-5304) para expressão de KARI.

#### **DELEÇÃO DE *ADH1* E INTEGRAÇÃO DE *kivD LL(Y)***

[0414] O gene *ADH1* foi deletado e substituído por a região de codificação de *kivD* de códon de *Lactococcus lactis* otimizado para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. O cassete sem marca para a deleção de *ADH1*-integração de *kivD\_LL(y)* foi primeiramente clonado em plasmídeo pUC19-URA3MCS, conforme descrito em Pedido nº. U.S.61/356379, depositado em 18 de junho de 2010, incorporado no presente documento por referência. O vetor tem base em pUC19 e contém a sequência do gene *URA3* de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D situado dentro de um sítio de clonagem múltipla (MCS). pUC19 contém o replicação de pMB1 e uma codificação de gene para beta-lactamase para réplica e seleção em *Escherichia coli*. Adicionalmente à sequência de codificação para *URA3*, as sequências de montante (250 bp) e jusante (150 bp) desse gene estão presentes para expressão do gene *URA3* em levedura. O vetor pode ser usado para propósitos de clonagem e pode ser usado como um vetor de integração de levedura.

[0415] A região de codificação de *kivD* de códon de *Lactococcus lactis* otimizado para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* foi amplificada com o uso de pLH468 (SEQ ID NO: 139) como modelo com iniciador oBP562 (SEQ ID NO: 197), que contém um sítio de restrição de PmeI, e iniciador oBP563 (SEQ ID NO: 198), que contém uma 5' extremidade com homologia à 5' terminação de Fragmento B de *ADH1*. Fragmento B de *ADH1* foi amplificado de DNA genômico preparado conforme acima com iniciador oBP564 (SEQ ID NO: 199), que contém uma 5' extremidade com homologia à 3' terminação de *kivD\_LL(y)*,

e iniciador oBP565 (SEQ ID NO:200), que contém um sítio de restrição de FseI. Produtos de PCR foram purificados com um kit de PCR Purification (Qiagen). Fragmento B de kivD\_LI(y)-ADH1 foi criado sobrepondo-se PCR misturando-se os produtos de PCR de kivD\_LI(y) e de Fragmento B de ADH1 e amplificando-se com Iniciadores oBP562 (SEQ ID NO: 197) e oBP565 (SEQ ID NO:200). O produto de PCR resultante foi digerido com PmeI e FseI e ligado com T4 DNA ligase nos sítios correspondentes de pUC19-URA3MCS após digestão com as enzimas apropriadas. Fragmento A de ADH1 foi amplificado de DNA genômico com iniciador oBP505 (SEQ ID NO:201), que contém um sítio de restrição de SacI, e iniciador oBP506 (SEQ ID NO:202), que contém um sítio de restrição de AseI. O produto de PCR de Fragmento A de ADH1 foi digerido com SacI e AseI e ligado com T4 DNA ligase nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém Fragmento B de kivD\_LI(y)-ADH1. Fragmento C de ADH1 foi amplificado de DNA genômico com iniciador oBP507 (SEQ ID NO:203), que contém um sítio de restrição de PaeI, e iniciador oBP508 (SEQ ID NO:204), que contém um sítio de restrição de SalI. O produto de PCR de Fragmento C de ADH1 foi digerido com PaeI e SalI e ligado com T4 DNA ligase nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém Fragmento A de ADH1-Fragmento B de kivD\_LI(y)-ADH1. O promotor híbrido UAS(PGK1)-P<sub>FBA1</sub> foi amplificado de vetor pRS316- UAS(PGK1)-P<sub>FBA1</sub>-GUS (SEQ ID NO:209) com iniciador oBP674 (SEQ ID NO:205), que contém um sítio de restrição de AseI, e iniciador oBP675 (SEQ ID NO:206), que contém um sítio de restrição de PmeI. O produto de PCR de UAS(PGK1)-P<sub>FBA1</sub> foi digerido com AseI e PmeI e ligado com T4 DNA ligase nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém Fragments ABC de kivD\_LI(y)-ADH1. Todo o cassete de integração foi amplificado do plasmídeo resultante com Iniciadores oBP505 (SEQ ID NO:201) e oBP508 (SEQ ID NO:204) e purificado com um kit de PCR Purification (Qiagen).

[0416] Células competentes de PNY1505 foram feitas e transformadas com o cassete de PCR de *ADH1-kivD\_LI(y)* construído acima com o uso de um kit de Frozen-EZ Yeast Transformation II (Zymo Research). Misturas de transformação foram plaqueadas em meio completo sintético sem uracil complementado com 1% etanol em 30°C. Transformantes foram cultivados em YPE (1% etanol) e plaqueados em meio completo sintético que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1%) em 30°C para selecionar isolados que perderam o marcador de *URA3*. A deleção de *ADH1* e integração de *kivD\_LI(y)* foram confirmados por PCR com Iniciadores externos oBP495 (SEQ ID NO:207) e oBP496 (SEQ ID NO:208) e com iniciador específico de *kivD\_LI(y)* oBP562 (SEQ ID NO: 197) e iniciador externo oBP496 (SEQ ID NO:208) com o uso de DNA genômico preparado com um kit de Gentra Puregene Yeast/Bact (Qiagen). O isolado correto foi selecionado como cepa CEN.PK 113-7D MATa *ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1tpdc5Δ::P[PDC5]- ADH|sadB\_Ax-PDC5t gpd2Δ::loxP fra2Δ adh1Δ::UAS(PGK1)P[FBA1]- kivD\_LI(y)-ADH1t* e designado como PNY1507 (BP1201). PNY1507 foi transformado com plasmídeos de via de isobutanol pYZ090 (SEQ ID NO: 195) e pBP915 (SEQ ID NO: 182) e a cepa resultante foi chamada PNY1513.

#### **CONSTRUÇÃO DO VETOR PRS316-UAS(PGK1)-FBA1P-GUS**

[0417] Para clonar um cassete *UAS(PGK1)-FBA1p* (SEQ ID NO: 766, primeiramente um de promotor *FBA1* (*FBA1p*) de 602 bp foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico de CEN.PK com Iniciadores T-*FBA1* (*Sall*) (SEQ ID NO:767) e B-*FBA1* (*SpeI*) (SEQ ID NO:768), e clonado em sítios de *Sall* e *SpeI* no plasmídeo *pWS358-PGK1p-GUS* (SEQ ID NO:769) após o promotor *PGK1p* ter sido removido com uma digestão por *Sall/SpeI* do plasmídeo, que rende *pWS358-FBA1p-GUS*. O plasmídeo *pWS358-PGK1p-GUS* foi gerado inserindo-se um *PGK1p* e fragmentos de DNA de gene beta-

glucuronidase (GUS) no sítio de clonagem múltipla de pWS358, que foi derivado de vetor pRS423 (Christianson *et al.*, Gene, 110:119 a 122, 1992). Em segundo lugar, o plasmídeo pWS358-FBA1p-GUS resultante foi digerido com Sall e SacI, um fragmento de DNA que contém um promotor FBA1p, gene GUS, e terminação FBA<sub>t</sub> purificado com gel, e clonado em sítios de Sall/SacI em pRS316 para criar pRS316-FBA1p-GUS. Em terceiro lugar, um fragmento de DNA de 118 bp que contém uma sequência de ativação a montante (UAS) localizada entre posições -519 e -402 a montante da estrutura de leitura aberta de 3-fosfoglicerato quinase (PGK1), nomeadamente UAS(PGK1), foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico de CEN.PK com Iniciadores T-U/PGK1 (KpnI) (SEQ ID NO:770) e B-U/PGK1 (Sall) (SEQ ID NO:771). O produto de PCR foi digerido com KpnI e Sall e clonado em sítios de KpnI/Sall em pRS316-FBA1p-GUS para criar pRS316- UAS(PGK1)-FBA1p-GUS.

### **EXEMPLO 9**

#### **CÉLULAS DE HOSPEDEIRO RECOMBINANTES APRIMORADAS QUE COMPREENDEM**

##### **ELIMINAÇÃO DE ALD6**

[0418] O propósito desse exemplo é descrever métodos para modificar uma cepa hospedeira de levedura para produção aprimorada de isobutanol. Essas modificações incluem integração de genes que codificam atividade de isobutiraldeído redutase e eliminação dos genes ALD6 e YMR226c nativos, que codifica dependente de acetaldeído desidrogenase NADP<sup>+</sup> e uma desidrogenase dependente de NADPH, respectivamente.

##### **CONSTRUÇÃO DE CEPA DE *S. CEREVISIAE* PNY2211**

[0419] PNY2211 foi construída em diversas etapas a partir de cepa de *S. cerevisiae* PNY1507 (Exemplo 8) conforme descrito nos parágrafos a seguir. Primeiramente, PNY1507 foi modificado para conter um gene de fosfoquetolase. A seguir, um gene de acetolactato sintase (*alsS*) foi adicionado à cepa, com o uso de um vetor de integração alvejado para sequências

adjacentes ao gene de fosfoquelase. Finalmente, recombinação homóloga foi usada para remover o gene de fosfoquelase e sequências de vetor de integração, que resulta em uma inserção sem marca de *alsS* na região intergênica entre *pdc1Δ::ilvD* (descrita no Exemplo 12) e o gene *TRX1* nativo de cromossomo XII. O genótipo resultante de PNY2211 é MATa *ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t-P[FBA1]-ALS|alsS\_Bs-CYC1tpdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB\_Ax-PDC5tgpd2Δ::loxP fra2Δ adh1Δ::UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_LI(y)-ADH1t*.

[0420]Um cassete de gene de fosfoquelase foi introduzido em PNY1507 por recombinação homóloga. A construção de integração foi gerada como se segue. O plasmídeo *pRS423::CUP1-alsS+FBA-budA* (anteriormente descrito em US2009/0305363, que é incorporado no presente documento por referência em sua totalidade) foi digerido com *NotI* e *XmaI* para remover o 1,8 kb de sequência de *FBA-budA*, e o vetor foi religado após tratamento com fragmento de Klenow. A seguir, o promotor *CUP1* foi substituído por uma variação de promotor de *TEF1* (variação de M4 anteriormente descrita por Nevoigt *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5266 a 5273 (2006), que é incorporado no presente documento por referência em sua totalidade) por meio de síntese de DNA e serviço de construção de vetor a partir de DNA2.0 (Menlo Park, CA). O plasmídeo resultante, *pRS423::TEF(M4)-alsS*, foi cortado com *StuI* e *MluI* (remove 1,6 kb de porção que contém parte do gene *alsS* e terminação *CYC1*), combinado com os 4 kb de produto de PCR gerados a partir de *pRS426::GPD-xpk1+ADH-eutD* (SEQ ID NO:383) com Iniciadores N1176 (SEQ ID NO:282) e N1177 (SEQ ID NO:283) e um DNA de produto de PCR de 0,8 kb (SEQ ID NO: 284) gerado a partir de DNA genômico de levedura (região de promotor *ENO1*) com Iniciadores N822 (SEQ ID NO:285) e N1178 (SEQ ID NO:286) e transformado em cepa de *S. cerevisiae* BY4741 (ATCC #201388); metodologia de clonagem de reparo



de vo, ver Ma *et al.* Gene 58:201 a 216 (1987). Transformantes foram obtidos plaqueando-se células em meio completo sintético sem histidina. Montagem apropriada do plasmídeo esperado (pRS423::TEF(M4)-xpk1+ENO1-eutD, SEQ ID NO:293) foi confirmada por PCR (Iniciadores N821 (SEQ ID NO:287) e N1115 (SEQ ID NO:288)) e por digestão de restrio (BglI). Dois clones foram subsequentemente sequenciados. O gene TEF(M4)-xpk1 de 3,1 kb foi isolado por digestão com *SacI* e *NotI* e clonado para o vetor pUC19-URA3::ilvD-TRX1 (Clone A, cortado com *AflI*). Fragmentos de clonagem foram tratados com fragmento de Klenow para gerar terminaes cegas para ligao. Reaes de ligao foram transformadas em células Stbl3 de *E. coli*, que seleciona por resistência a ampicilina. Insero de TEF(M4)-xpk1 foi confirmada por PCR (Iniciadores N1110 (SEQ ID NO:367) e N1114 (SEQ ID NO:290)). O vetor foi linearizado com *AflI* e tratado com fragmento de Klenow. O cassete resistente a KpnI-HincII geneticina (SEQ ID NO: 384) de 1,8 kb foi clonado por ligao após tratamento por fragmento de Klenow. Reaes de ligao foram transformadas em células Stbl3 de *E. coli*, que seleciona por resistência a ampicilina. Insero do cassete de geneticina foi confirmada por PCR (Iniciadores N160SeqF5 (SEQ ID NO:210) e BK468 (SEQ ID NO:368)). A sequência de plasmídeo  fornecida como SEQ ID NO. 291 (pUC19-URA3::pdct::TEF(M4)-xpk1::kan).

[0421]O cassete de integrao resultante (pdc1::TEF(M4)-xpk1::KanMX::TRX1) foi isolado {digestão de *Ascl* e *NaeI* gerou uma banda de 5,3 kb que foi purificada por gel) e transformado em PNY1507 com o uso do Zymo Research Frozen-EZ Yeast Transformation Kit (Cat. n. T2001). Transformantes foram selecionados por plaqueamento em YPE mais 50 g/ml de G418. Integrao no local esperado foi confirmada por PCR (Iniciadores N886 (SEQ ID NO:211) e N1214 (SEQ ID NO:281)). A seguir, plasmídeo

pRS423::GAL1p-Cre (SEQ ID NO:271), que codifica Cre recombinase, foi usado para remover o cassete de KanMX dividido por loxP. Remoção apropriada do cassete foi confirmada por PCR (Iniciadores oBP512 (SEQ ID NO: 337) e N160SeqF5 (SEQ ID NO:210)). Finalmente, o plasmídeo integração *alsS* descrito no Exemplo 13, pUC19-kan::pdc1::FBA-alsS::TRX1, clone A) foi transformado nessa cepa com o uso do marcador de seleção de geneticina incluído. Dois integrantes foram testados por atividade de acetolactato sintase por transformação com plasmídeos pYZ090 $\Delta$ alsS (SEQ ID NO:371) e pBP915 (SEQ ID NO: 182) (transformado com o uso de Protocolo #2 em Amberg, Burke e Strathern "Methods in Yeast Genetics" (2005)), e avaliação de crescimento e produção de isobutanol em meio que contém glicose (métodos para crescimento e medição de isobutanol são como se segue: Todas as cepas foram cultivadas em meio completo sintético, menos histidina e uracil que contém 0,3% de glicose e 0,3% de etanol como fontes de carbono (10 mL de meio em 125 mL de frascos de Erlenmeyer ventilados (VWR Cat. n°. 89095-260). Após incubação ao longo da noite (30°C, 250 rpm em um Innova®40 New Brunswick Scientific Shaker), culturas foram diluídas novamente para 0,2 QD (medição de Eppendorf BioPhotometer) em meio completo sintético que contém 2% de glicose e 0,05% de etanol (20 ml de meio em 125 mL de frascos de Erlenmeyer fortemente tampados (VWR Cat. n°. 89095-260)). Após incubação de 48 horas (30°C, 250 rpm em um Innova®40 New Brunswick Scientific Shaker), sobrenadantes de cultura (coletados com o uso de unidades de filtro de tubo de centrífuga Spin-X, Costar Cat. n°. 8169) foram analisados por HPLC por métodos descritos em Pub. de Pedido n°. U.S. 2007/0092957, que é incorporado no presente documento por referência em sua totalidade) Um dos dois clones era positivo e foi nomeado PNY2218.

[0422] PNY2218 foi tratado com Cre recombinase e os clones resultantes foram submetidos a triagem para perda do gene *xpk1* e sequências

de vetor de integração pUC19 por PCR (Iniciadores N886 (SEQ ID NO: 211) e N160SeqR5 (SEQ ID NO: 388)). Isso deixou somente o gene *alsS* integrado na região intergênica *pdcl-TRX1* após recombinação do DNA a montante de *xpk1* e o DNA homólogo introduzido durante inserção do vetor de integração (uma inserção "sem marca" uma vez que sequências de *loxP*, gene marcador e vetor são perdidos). Embora essa recombinação poderia ter ocorrido em qualquer ponto, a integração de vetor aparentava ser estável mesmo sem seleção de geneticina e o evento de recombinação foi somente observado após introdução da Cre recombinase. Um clone foi designado PNY221 1.

[0423] Um isolado de PNY2218 que contém os plasmídeos pYZ090 $\Delta$ *alsS* e pBP915 foi designado PNY2209.

#### **PNY1528 (INTEGRAÇÕES DE HADH EM PNY2211)**

[0424] Deleções/integrações foram criadas por recombinação homóloga com produtos de PCR que contêm regiões de homologia a montante e a jusante da região alvo e o gene *URA3* para seleção de transformantes. O gene *URA3* foi removido por recombinação homóloga para criar uma deleção/integração sem marca.

#### **DELEÇÃO DE *YPRCΔ15* E INTEGRAÇÃO DE *ADH* DE FÍGADO DE CAVALO**

[0425] O local de *YPRCΔ15* foi deletado e substituído pelo gene *adh* de fígado de cavalo, otimizado por códon para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, junto com a região de promotor PDC5 (538 bp) a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e a região de terminação ADH1 (316 bp) a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. O cassete sem marca para a deleção de *YPRCΔ15*-integração de P[PDC5]- *adh*<sub>HL</sub>(y)-ADH1t foi primeiramente clonado em plasmídeo pUC19- *URA3MCS* (descrito no Exemplo 8).

[0426] Fragmentos A-B-U-C foram amplificados com o uso de Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs; Ipswich, MA) e DNA genômico CEN.PK 113-7D como modelo, preparados com um kit de

Gentra Puregene Yeast Bact (Qiagen; Valencia, CA). Fragmento A de YPRC $\Delta$ 15 foi amplificado a partir de DNA genômico com iniciador oBP622 (SEQ ID NO: 212), que contém um sítio de restrição de KpnI, e iniciador oBP623 (SEQ ID NO: 213), que contém uma 5' extremidade com homologia à 5' terminação de Fragmento B de YPRC $\Delta$ 15. Fragmento B de YPRC $\Delta$ 15 foi amplificado a partir de DNA genômico com iniciador oBP624 (SEQ ID NO: 214), que contém uma 5' extremidade com homologia à 3' terminação de Fragmento A de YPRC $\Delta$ 15, e iniciador oBP625 (SEQ ID NO: 215), que contém um sítio de restrição de FseI. produtos de PCR foram purificados com um kit de PCR Purification (Qiagen). Fragmento A de YPRC $\Delta$ 15-Fragmento B de YPRC $\Delta$ 15 foi criado sobrepondo-se PCR misturando-se os produtos de PCR de Fragmento A de YPRC $\Delta$ 15 e de Fragmento B de YPRC $\Delta$ 15 e amplificando-se com Iniciadores oBP622 (SEQ ID NO: 212) e oBP625 (SEQ ID NO: 215). O produto de PCR resultante foi digerido com KpnI e FseI e ligado com T4 DNA ligase nos sítios correspondentes de pUC19-URA3MCS após digestão com as enzimas apropriadas. Fragmento C de YPRC $\Delta$ 15 foi amplificado a partir de DNA genômico com iniciador oBP626 (SEQ ID NO: 216), que contém um sítio de restrição de NotI, e iniciador oBP627 (SEQ ID NO: 217), que contém um sítio de restrição de Pad. O produto de PCR de Fragmento C de YPRC $\Delta$ 15 foi digerido com NotI e Pad e ligado com T4 DNA ligase nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém Fragmentos AB de YPRC $\Delta$ 15. A região de promotor PDC5 foi amplificada a partir de DNA genômico CEN.PK 113-7D com iniciador HY21 (SEQ ID NO: 218), que contém um sítio de restrição de Ascl, e iniciador HY24 (SEQ ID NO: 219), que contém uma 5' extremidade com homologia à 5' terminação de adh<sub>HI</sub>(y). adh<sub>HI</sub>(y)-ADH1t foi amplificado a partir de pBP915 (SEQ ID NO: 182) com Iniciadores HY25 (SEQ ID NO: 220), que contém uma 5' extremidade com homologia à 3' terminação de P[PDC5], e HY4 (SEQ ID NO: 221), que contém um sítio de restrição de PmeI.

Produtos de PCR foram purificados com um kit de PCR Purification (Qiagen). P[PDC5]-adh\_HL(y)-ADH1t foi criado sobrepondo-se PCR misturando-se os produtos de PCR de P[PDC5] e adh\_HL(y)-ADH1t e amplificando-se com Iniciadores HY21 (SEQ ID NO: 218) e HY4 (SEQ ID NO: 221). O produto de PCR resultante foi digerido com *AscI* e *PmeI* e ligado com T4 DNA ligase nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém Fragmentos AB de YPRCΔ15C. Todo o cassete de integração foi amplificado a partir do plasmídeo resultante com Iniciadores oBP622 (SEQ ID NO: 212) e oBP627 (SEQ ID NO: 217).

[0427] Células competentes de PNY2211 foram feitas e transformadas com o produto de PCR de cassete de deleção de *YPRCΔ15* - integração de P[PDC5]-adh\_HL(y)-ADH1t que usa um kit de Transformação de Levedura Frozen-EZ II (Zymo Research; Orange, CA). As misturas de transformação foram plaqueadas em meios totalmente sintéticos que não têm uracila suplementada com 1 % de etanol a 30 °C. Os transformantes foram submetidos à triagem por PCR com Iniciadores na terminação F URA3 (SEQ ID NO: 222) e oBP637 (SEQ ID NO: 224). Os transformantes corretos foram cultivados em YPE (1 % de etanol) e plaqueados em meio completamente sintético suplementado com 1 % de EtOH e que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1 %) a 30 °C para selecionar por isolados que perderam o marcador URA3. A deleção de *YPRCΔ15* e a integração de P[PDC5]-adh\_HL(y)-ADH1t foram confirmadas por PCR com Iniciadores externos oBP636 (SEQ ID NO: 223) e oBP637 (SEQ ID NO: 224) pelo uso de DNA genômico preparado com um Kit para Levedura de DNA Genômico (Zymo Research). Um isolado correto do seguinte genótipo foi selecionado para modificação adicional: CEN.PK 113-7D MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t-P[FBA1]-ALS|alsS\_Bs-CYC1t pdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB\_Ax-PDC5t

*gpd2Δ::loxP*      *fra2Δ*      *adh1Δ::UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_LI(y)-ADH1t*  
*YPRCΔ15Δ::P[PDC5]- ADH|adh\_HI-ADH1t*.

### **INTEGRAÇÃO DE *ADH* NO FÍGADO DE CAVALO EM *FRA2Δ***

[0428] O gene *adh* fígado de cavalo, códon otimizado para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* junto com a região promotora de *PDC1* (870 bp) de *Saccharomyces cerevisiae* e a região terminal de *ADH1* (316 bp) de *Saccharomyces cerevisiae*, foi integrado ao sítio da deleção *fra2*. O cassete sem marcas para a integração *fra2Δ*- P[PDC1]-*adh\_HI*(y)-ADH1t foi clonada primeiro em um plasmídeo pUC19-URA3MCS.

[0429] Os fragmentos A-B-U-C foram amplificados pelo uso de Mistura Mestre PCR de Alta Fidelidade Phusion (New England BioLabs; Ipswich, MA) e DNA genômico CEN.PK 113-7D como modelo preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen; Valencia, CA). O fragmento C de *fra2Δ* foi amplificado de DNA genômico com o iniciador oBP695 (SEQ ID NO: 229) que contém um sítio de restrição NotI e iniciador oBP696 (SEQ ID NO: 230) que contém um sítio de restrição PaeI. O produto de PCR de fragmento C de *fra2Δ* foi digerido com NotI e PaeI e ligado com DNA ligase T4 nos sítios correspondentes de pUC19-URA3MCS. O fragmento B de *fra2Δ* foi amplificado do DNA genômico com o iniciador oBP693 (SEQ ID NO: 227) que contém um sítio de restrição PmeI e o iniciador oBP694 (SEQ ID NO: 228) que contém um sítio de restrição FseI. O produto de PCR resultante foi digerido com PmeI e FseI e ligado com DNA ligase T4 nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém fragmento C de *fra2Δ* após a digestão com as enzimas apropriadas. O fragmento A de *fra2Δ* foi amplificado do DNA genômico com o iniciador oBP691 (SEQ ID NO: 225) que contém sítios de restrição BamHI e AsiSI e iniciador oBP692 (SEQ ID NO: 226) que contém sítios de restrição AscI e SmaI. O fragmento A de produto de PCR de *fra2Δ* foi digerido com BamHI e AscI e ligado com DNA ligase T4 nos sítios

correspondentes do plasmídeo que contém fragmentos BC de *fra2Δ* após a digestão com as enzimas apropriadas. A região promotora de PDC1 foi amplificada de DNA genômico de CEN.PK 113-7D com iniciador HY16 (SEQ ID N<sup>o</sup>. 231) que contém um sítio de restrição de *Ascl* e iniciador HY19 (SEQ ID NO: 232) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do *adh\_HI(y)*. *adh\_HI(y)*-ADH1t foi amplificada de pBP915 com Iniciadores HY20 (SEQ ID NO: 233), que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' de P[PDC1] e HY4 (SEQ ID NO: 221) que contém um sítio de restrição de *PmeI*. Os produtos de PCR foram purificados com um kit de Purificação de PCR (Qiagen). O P[PDC1]-*adh\_HI(y)*-ADH1t foi criado pela sobreposição PCR pela mistura do P[PDC1] e do *adh\_HI(y)*-ADH1t, os produtos de PCR e que amplifica com Iniciadores HY16 (SEQ ID NO: 231) e HY4 (SEQ ID NO: 221). O produto de PCR resultante foi digerido com *Ascl* e *PmeI* e ligado com DNA ligase T4 nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém fragmentos ABC de *fra2Δ*. O cassete de integração inteiro foi amplificado a partir do plasmídeo resultante com Iniciadores oBP691 (SEQ ID NO: 225) e oBP696 (SEQ ID NO: 230).

[0430] Células competentes da variante PNY2211 com *adh\_HI(y)* integrado em *YPRCΔ15* foram feitas e transformadas com o produto de PCR de cassete de integração *fra2Δ*- P[PDC1]- *adh\_HI(y)*-ADH1t pelo uso de um Kit de Transformação de Levedura Frozen-EZ II (Zymo Research). As misturas de transformação foram plaqueadas em meios totalmente sintéticos que não têm uracila suplementados com 1 % de etanol a 30 °C. Os transformantes foram submetidos à triagem para PCR com Iniciadores de terminação F URA3 (SEQ ID NO: 222) e oBP731 (SEQ ID NO: 235). Os transformantes corretos foram cultivados em YPE (1 % etanol) e plaqueados em meio completamente sintético suplementado com 1 % de EtOH e que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1 %) a 30 °C para selecionar isolados que perderam o marcador URA3. A

integração de P[PDC1 ]-adh<sub>HL</sub>(y)-ADH1t foi confirmado pelo PCR de colônia com iniciador interno HY31 (SEQ ID NO: 236) e iniciador externo oBP731 (SEQ ID NO: 235) e PCR com Iniciadores externos OBP730 (SEQ ID NO: 234) e oBP731 (SEQ ID NO: 235) pelo uso de DNA genômico preparado com um Kit para Levedura de DNA Genômico (Zymo Research). Um isolado correto do seguinte genótipo foi designado PNY1528. CEN.PK 113-7D MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1 Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t-P[FBA1]-ALS|alsS\_Bs-CYC 11 pdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB\_Ax-PDC5t gpd2Δ::loxP fra2Δ::P[PDC1]-ADH|adh<sub>HI</sub>-ADH1t adh1Δ::UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_LI(y)-ADH1t YPRCΔ15Δ::P[PDC5]-ADH|adh<sub>HI</sub>-ADH1t.

#### **PNY2237 (DELEÇÃO DE YMR226C SEM MARCA)**

[0431] O gene YMR226c foi deletado da cepa PNY1528 de *S. cerevisiae* pela recombinação homóloga pelo uso de um cassete de deleção sem marca linear 2,0 kb com PCR amplificado. O cassete foi construído a partir de fragmentos com PCR amplificado unidos compreendidos do gene URA3 junto com o promotor nativo do mesmo e terminador conforme um marcador selecionável, divisa de sequências homologas a jusante e a montante do local cromossômico do gene YMR226c para promover a integração do cassete de deleção e remoção da sequência interveniente do nativo e uma sequência de repetição para promover recombinação e remoção do marcador URA3. Os Iniciadores PCR direto e reverso (N1251 e N1252, SEQ ID NOs: 247 e 248 respectivamente), amplificados por um cassete de expressão de URA3 de 1.208 bp que origina de pLA33 (pUC19::loxP-URA3-loxP (SEQ ID NO: 268)). Iniciadores direto e reverso (N1253 e N1254, SEQ ID NOs: 249 e 250 respectivamente), amplificados a uma sequência homóloga a jusante de 250 bp com uma etiqueta de sequência de sobreposição URA3 3' de um preparo de DNA genômico da cepa PNY2211 de *S. cerevisiae* (acima). Iniciadores PCR direto e reverso (N1255 e N1256, SEQ ID NOs: 251 e 252 respectivamente)



amplificados a uma sequência de repetição de 250 bp com uma etiqueta de sobreposição de URA3 5' de um preparo de DNA genômico da Cepa PNY2211 de *S. cerevisiae*. Iniciadores PCR direto e reverso (N1257 e N1258, SEQ ID NOs: 253 e 254 respectivamente) amplificados a uma sequência homóloga a montante de 250 bp com uma etiqueta de sequência de sobreposição de repetição 5' de um preparo de DNA genômico da Cepa PNY2211 de *S. cerevisiae*.

[0432] Aproximadamente 1,5 µg do cassete amplificado de PCR foi transformada na cepa PNY1528 (acima) tornada competente pelo uso do Kit de Transformação de Levedura Congelada de Pesquisa ZYMO e a mistura de transformação plaqueada em SE 1,0 % de uracila e incubada a 30 °C para seleção de células com um cassete *ymr226cΔ::URA3* integrado. Os transformantes que aparecem após 72 a 96 horas são subsequentemente marcados com listras curtas no mesmo meio e incubados a 30 °C por 24 a 48 horas. As listras curtas são submetidas à triagem para *ymr226cΔ::URA3* pelo PCR com um iniciador interno específico de cassete de deleção URA3 voltado para fora 5' (N1249, SEQ ID NO: 245) pareado com um iniciador específico de cromossomo voltado para dentro de divisa (N1239, SEQ ID NO: 243) e um iniciador específico de cassete de deleção URA3 voltado para fora 3' (N1250, SEQ ID NO: 246) pareado com um iniciador específico de cromossomo voltado para dentro de divisa (N1242, SEQ ID NO: 244). Uma triagem de PCR PNY1528 *ymr226cΔ::URA3* positiva resultou em produtos de PCR 5' e 3' de 598 e 726 bp, respectivamente.

[0433] Três clones PNY1528 *ymr226cΔ::URA3* positivos foram coletados e cultivados durante a noite em um meio de 1 % de YPE do qual 100 µl foram plaqueados em YPE 1 % + 5-FOA para remoção de marcador. As colônias que aparecem após 24 a 48 horas foram submetidas à triagem PCR para perda de marcador com Iniciadores específicos de cromossomo 5' e 3'

(N1239 e N1242). Uma triagem de PCR sem marcador PNY1528 ymr226cΔ positiva resultou em um produto de PCR de 801 bp. Múltiplos clones foram obtidos e um foi designado como PNY2237.

#### **PNY2238 E PNY2243 (CEPAS DE DELEÇÃO DE ALD6)**

[0434] Um vetor foi projetado para substituir a sequência de codificação *ALD6* com um marcador de seleção URA3 reciclável Cre-lox. As sequências 5' e 3' de *ALD6* foram amplificadas por PCR (pares de iniciador N1179 e N1180 e N1181 e N1182 respectivamente; SEQ ID NOs: 237, 238, 239 e 240 respectivamente). Após clonar esses fragmentos em vetores TOPO (Invitrogen Cat. N<sup>o</sup>. K2875-J10) e sequenciamento (Iniciadores direto (SEQ ID NO:269) e reverso (SEQ ID NO:270) M13), as divisas 5' e 3' foram clonadas em pLA33 (pUC19::loxP::URA3::loxP) (SEQ ID NO:268) nos sítios *EcoRI* e *SphI* respectivamente. Cada reação de ligação foi transformada em células Stbl3 de *E. coli* que foram incubadas em placas Amp LB para seleção para transformantes. A inserção apropriada de sequências foi confirmada por PCR (Iniciadores diretos M13 (SEQ ID NO: 269) e N1180 (SEQ ID NO:238) e reversos M13 (SEQ ID NO:270) e N1181 (SEQ ID NO:239) respectivamente).

### **EXEMPLO 10**

#### **PLASMÍDEOS DE VIA DE ISOBUTANOL**

[0435] A finalidade desse exemplo é descrever uma construção ou modificação de plasmídeos de via de isobutanol para produção de isobutanol em cepas hospedeiras.

[0436] O pYZ067 (SEQ ID NO:374) foi construído para conter os seguintes genes quiméricos: 1) a região de codificação do gene *ilvD* do UA159 de *S. mutans* com uma etiqueta Lumio de terminal C expressa do promotor FBA1 de levedura seguida pelo Terminador FBA1 para expressão de desidratase de ácido dihidróxi, 2) a região de codificação para ADH de fígado de cavalo expressa a partir do promotor GPM1 de levedura seguida pelo

terminador ADH1 para expressão de desidrogenase de álcool e 3) a região de codificação do gene *KivD* de *Lactococcus lactis* expresso a partir do promotor TDH3 de levedura seguida pelo terminador TDH3 para expressão de descarboxilase de quetoisovalerato.

[0437] O pYZ067 $\Delta$ kivD $\Delta$ hADH (SEQ ID NO: 385) foi construído a partir de pYZ067 (SEQ ID NO: 374) pela deleção dos cassetes de terminador de gene promotor para tanto *kivD* quanto *adh*. O pYZ067 foi digerido com BamHI e SacI (New England BioLabs; Ipswich, MA) e o fragmento 7934 bp foi purificado em um gel de agarose seguido por um Kit de Extração de Gel (Qiagen; Valencia, CA). O fragmento isolado de DNA foi tratado com DNA polimerase I, Fragmento (Klenow) Grande (New England BioLabs; Ipswich, MA) e, então, autoligado com DNA ligase T4 e usado para transformar *Escherichia coli* TOP10 competente (Invitrogen; Carlsbad, CA). Os plasmídeos dos transformantes foram isolados e verificados pela deleção apropriada por análise de sequência. Um plasmídeo isolado correto foi designado como pYZ067 $\Delta$ KivD $\Delta$ hADH.

[0438] O pYZ067 $\Delta$ KivD $\Delta$ ilvD (SEQ ID NO: 772) foi construído para conter um gene quimérico que tem a região de codificação do gene *adh* de fígado de cavalo (posição nt 3148-2021), códon otimizado para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, expresso a partir do promotor GPM de levedura (nt 3916-3160) e seguido pelo terminador ADH1 (nt 2012-1697) para expressão de ADH. O pYZ067 $\Delta$ kivD $\Delta$ ilvD foi construído a partir de pYZ067 pela deleção dos cassetes terminadores de gene promotor tanto para *kivD* quanto para *ilvD*. O pYZ067 foi digerido com AatII e SacI (New England BioLabs; Ipswich, MA) e o fragmento 10196 bp foi purificado em um gel de agarose seguido por um Kit de Extração de Gel (Qiagen; Valencia, CA). O fragmento isolado de DNA foi tratado com DNA polimerase I, Fragmento (Klenow) Grande (New England BioLabs; Ipswich, MA) e, então, autoligado com DNA ligase T4. O plasmídeo

resultante foi, então, digerido com NgoMIV e com BamHI (New England BioLabs; Ipswich, MA) e o fragmento 7533 bp foi purificado em um gel de agarose seguido por um Kit de Extração de Gel (Qiagen; Valencia, CA). O fragmento isolado de DNA foi tratado com DNA polimerase I, Fragmento (Klenow) Grande (New England BioLabs; Ipswich, MA) e, então, autoligado com DNA ligase T4. Os plasmídeos foram isolados e verificados pelas deleções apropriadas por análise de sequência. Um plasmídeo isolado correto foi designado como pYZ067DkivDDilvD.

[0439] O pK9G9.OLE1 p.ilvD (SEQ ID NO: 773) derivado a partir de pYZ090 (SEQ ID NO: 195) foi construído para conter um gene quimérico que tem a região de codificação do gene ilvD de *Streptococcus mutans* (posição nt 5377-3641) expresso a partir do promotor OLE1 de levedura (nt 5986-5387) e seguida pelo Terminador FBA1 (nt 3632-3320) para expressão de DHAD e um gene quimérico que tem a região de codificação da variante K9G9 do gene ilvC de *Anaerostipes caccae* (ácido nucléico e aminoácido SEQ ID NOs: 774 e 647) (nt 1628-2659) expresso a partir do promotor ILV5 de levedura (nt 427-1620) e seguido pelo Terminador ILV5 (nt 2685- 3307) para expressão de KARI. A construção do plasmídeo foi conforme a seguir. O gene quimérico do plasmídeo pYZ067 que tem a região de codificação do gene ilvD de *Streptococcus mutans* expressa a partir do promotor FBA1 de levedura e seguida pelo Terminador FBA1 foi ligado no pYZ090 após digestão com enzimas de restrição NgoMIV e BamHI. A região de codificação alsS e 280 bp da terminação 3' do promotor CUP1 foram deletados do plasmídeo resultante pela digestão com as enzimas de restrição SpeI e PaeI e autoligada ao fragmento de DNA grande resultante. O promotor FBA1 de levedura a montante de ilvD foi removido do plasmídeo resultante pela digestão com as enzimas de restrição NgoMIV e PmlI e foi substituído pelo promotor OLE1 de levedura amplificado com Iniciadores pOLE1-NgoMI (SEQ ID NO: 775) e

pOLE1-PmII (SEQ ID NO: 776). Uma região de codificação do gene *ilvC* de *Lactococcus lactis* foi deletada do plasmídeo resultante pela digestão com enzimas de restrição PmeI e SfiI seguida pela purificação com gel do fragmento de DNA grande. A região de codificação da variante K9G9 de gene *ilvC* (SEQ ID NO: 777) de *Anaerostipes caccae* foi digerida de pLH701 (SEQ ID NO: 778) com PmeI e SfiI e purificada com gel. Os dois fragmentos de DNA foram ligados para gerar pK9G9.OLE1 p.*ilvD*.

### **EXEMPLO 11**

#### **CONSTRUÇÃO DE PNY2240 E PNY2242**

[0440] A cepa PNY2240 foi derivada a partir de PNY2211 após transformação com plasmídeos pLH702 (SEQ ID NO: 181) e pBP915 (SEQ ID NO: 182). Os transformantes foram plaqueados em meio completamente sintético sem histidina ou uracila (1% de etanol como fonte de carbono). Os transformantes foram remendados ao mesmo meio que contém, ao invés disso, 2% de glicose e 0,05% de etanol como fontes de carbono. Três remendos foram usados para inocular um meio líquido (completamente sintético menos uracila com 0,3 % de glicose e 0,3% de etanol como fontes de carbono). Para testar a produção de isobutanol, culturas líquidas foram subcultivadas em um meio completamente sintético menos uracila que contém 2% de glicose e 0,05% de etanol como fontes de carbono que também continha uma mistura de vitamina BME (Categoria Sigma N<sup>o</sup>. B6891). As culturas foram incubadas em recipientes de soro vedados (10 ml de meio em recipientes de 15 ml) a 30 °C com agitação (250 rpm em um agitador Infors Multitron). Após 48 horas, o meio de cultura foi filtrado (coluna Spin-X) e analisado pelo HPLC (conforme descrito na Publicação de Depósito N<sup>o</sup>. US2007/0092957 que é incorporada inteiramente no presente documento a título de referência). Um clone foi designado como PNY2240.

[0441] A cepa PNY2242 foi derivada de PNY2238 após transformação com plasmídeos pLH702 (SEQ ID NO: 181) e pYZ067ΔKivDΔhADH (descritos no presente documento acima). Os transformantes foram plaqueados em meio completamente sintético sem histidina ou uracila (1 % de etanol como fonte de carbono). Os transformantes foram remendados ao mesmo meio que contém, ao invés disso, 2% de glicose e 0,05% de etanol como fontes de carbono. Três remendos foram testados para a produção de isobutanol conforme descrita acima. Todos três tiveram desempenhos similares em termos de consumo de glicose e produção de isobutanol. Um clone foi designado como PNY2242 e foi adicionalmente caracterizado sob condições de fermentação conforme descrito no presente documento abaixo.

### **EXEMPLO 12**

#### **CONSTRUÇÃO DA CEPA BP1064 DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (PNY1503)**

[0442] A cepa BP1064 foi derivada de CEN.PK 113-7D (CBS 8340; Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, Holanda) e contém deleções dos seguintes genes: URA3, HIS3, PDC1, PDC5, PDC6 e GPD2. A BP1064 foi transformada com plasmídeos pYZ090 (SEQ ID NO: 195) e pLH468 (SEQ ID NO: 139) para criar a cepa NGCI-070 (BP1083; PNY1504).

[0443] As deleções que removeram completamente a sequência de codificação inteira foram criadas pela recombinação homóloga com fragmentos PCR que contêm regiões de homologia a montante e a jusante do gene alvo e ou um marcador de resistência G418 ou gene URA3 para seleção de transformantes. O marcador de resistência G418, dividido pelos sítios loxP, foi removido pelo uso de recombinase Cre (pRS423::PGAL1-cre; SEQ ID Nº. 271). O gene URA3 foi removido pela recombinação homóloga para criar uma

deleção sem marca ou se dividido pelos sítios loxP foi removido pelo uso de recombinase Cre.

### **DELEÇÃO DE URA3**

[0444] Para deletar a região de codificação URA3 endógena, um cassete de *ura3::loxP-kanMX-loxP* foi amplificado com PCR do modelo de DNA pl\_A54 (SEQ ID NO:386). O pLA54 contém o promotor TEF1 de *K. lactis* e marcador kanMX e é dividido pelos sítios loxP para permitir a recombinação com recombinase Cre e remoção do marcador. O PCR foi feito pelo uso de polimerase de DNA Phusion e Iniciadores BK505 e BK506 (SEQ ID NOs:294 e 295). A porção URA3 de cada iniciador foi derivada a partir da região 5' a montante do promotor URA3 e região 3' a jusante da região de codificação de forma que a integração do marcador loxP-kanMX-loxP resultou na substituição da região de codificação URA3. O produto de PCR foi transformado em CEN.PK 113-7D pelo uso de técnicas de genética comuns (Métodos in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, páginas 201 a 202) e transformantes foram selecionados em YPD que contém G418 (100 µg/ml) a 30 °C. Os transformantes foram submetidos à triagem para verificar integração correta por PCR pelo uso de Iniciadores LA468 e LA492 (SEQ ID NOs:296 e 297) e designado como CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::kanMX.

### **DELEÇÃO DE HIS3**

[0445] Os quatro fragmentos para o cassete de PCR para a deleção de HIS3 sem marca foram amplificados pelo uso de Mistura Mestre PCR de Alta Fidelidade Phusion (New England BioLabs; Ipswich, MA) e DNA genômico CEN.PK 113-7D como modelo preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen; Valencia, CA). O fragmento A de HIS3 foi amplificado com o iniciador oBP452 (SEQ ID NO:298) e o iniciador oBP453 (SEQ ID NO:299) que contém a extremidade 5' com homologia a terminação 5' do Fragmento B de HIS3. O Fragmento B de HIS3 foi amplificado com o

iniciador oBP454 (SEQ ID NO:300) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do Fragmento A de HIS3 e iniciador oBP455 (SEQ ID NO:301) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do fragmento U de HIS3. O fragmento U de HIS3 foi amplificado com o iniciador oBP456 (SEQ ID NO:302) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do fragmento B de HIS3 e iniciador oBP457 (SEQ ID NO:303) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do fragmento C de HIS3. O Fragmento C de HIS3 foi amplificado com o iniciador oBP458 (SEQ ID NO:304) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do fragmento U de HIS3 e iniciador oBP459 (SEQ ID NO:305). Os produtos de PCR foram purificados com um kit de Purificação de PCR (Qiagen). O fragmento AB de HIS3 foi criado pela sobreposição PCR pela mistura de Fragmento A de HIS3 Fragmento B de HIS3 e amplificação com Iniciadores oBP452 (SEQ ID NO:298) e oBP455 (SEQ ID NO:301). O Fragmento UC de HIS3 foi criado pela sobreposição de PCR pela mistura de Fragmento U de HIS3 e Fragmento C de HIS3 e amplificação com Iniciadores oBP456 (SEQ ID NO:302) e oBP459 (SEQ ID NO:305). Os produtos de PCR resultantes foram purificados em um gel de agarose seguido por um Kit de Extração de Gel (Qiagen). O cassete ABUC de HIS3 foi criado pela sobreposição de PCR pela mistura de Fragmento AB de HIS3 e Fragmento UC de HIS3 e amplificação com Iniciadores oBP452 (SEQ ID NO:298) e oBP459 (SEQ ID NO:305). O produto de PCR foi purificado com um kit de Purificação de PCR (Qiagen).

[0446] As células competentes de CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::kanMX foram feitas e transformadas com o Cassete ABUC de HIS3 de PCR pelo uso de um Kit de Transformação de Levedura Frozen-EZ II (Zymo Research; Orange, CA). As misturas de transformação foram plaqueadas em meios totalmente sintéticos que não têm uracila suplementada com 2% de glicose a



30 °C. Os transformantes com um nocaute de his3 foram submetidos à triagem por PCR com Iniciadores oBP460 (SEQ ID NO:306) e oBP461 (SEQ ID NO:307) pelo uso de DNA genômico preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). Um transformante correto foi selecionado como uma cepa de CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::kanMX  $\Delta$ his3::URA3.

### **REMOÇÃO DE MARCADOR KANMX DO SÍTIO $\Delta$ URA3 E REMOÇÃO DE MARCADOR URA3 DO SÍTIO $\Delta$ HIS3**

[0447] O marcador KanMX foi removido pela transformação de CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::kanMX  $\Delta$ his3::URA3 com pRS423::PGAL1-cre (SEQ ID NO: 271 ,) pelo uso de um Kit de Transformação de Levedura Frozen-EZ II (Zymo Research) e plaqueamento em meio completamente sintético que não tem histidina e uracila suplementada com 2 % de glicose a 30 °C. Os transformantes foram cultivados no YP suplementado com 1% de galactose a 30 °C por ~6 horas para induzir o Recombinase Cre e a excisão de marcador KanMX e plaqueadas em placas YPD (2% de glicose) a 30 °C para recuperação. Um isolado foi cultivado durante a noite em YPD e plaqueado em meio completamente sintético que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1%) a 30 °C para seleção por isolados que perderam o marcador URA3. Isolados resistentes a 5-FOA foram cultivados e plaqueados em YPD para remoção do plasmídeo pRS423::PGAL1-cre. Os isolados foram verificados para a perda do marcador KanMX, marcador URA3 e plasmídeo pRS423::PGAL1-cre pelo cultivo para ensaio em placas YPD+G418, placas de meio completamente sintético sem uracila e placas de meio completamente sintético sem histidina. Um isolado correto que foi sensível a G418 e auxotrófico para uracila e histidina foi selecionado como a cepa CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3 e designado como BP857. As deleções e remoção de marcador foram confirmadas por PCR e sequenciamento com Iniciadores oBP450 (SEQ ID NO:308) e oBP451 (SEQ ID NO:309) para  $\Delta$ ura3 e Iniciadores oBP460 (SEQ

ID NO:306) e oBP461 (SEQ ID NO:307) para  $\Delta$ his3 pelo uso de DNA genômico com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen).

#### **DELEÇÃO DE PDC6**

[0448] Os quatro fragmentos para o Cassete de PCR para a deleção de PDC6 sem marca foram amplificados pelo uso de Mistura Mestre PCR de Alta Fidelidade Phusion (New England BioLabs) e DNA genômico CEN.PK 113-7D como modelo preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). O fragmento A de PDC6 foi amplificado com o iniciador oBP440 (SEQ ID NO:310) e o iniciador oBP441 (SEQ ID NO:311) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' de fragmento B de PDC6. O fragmento B de PDC6 foi amplificado com iniciador oBP442 (SEQ ID NO:312) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' de fragmento A de PDC6 e iniciador oBP443 (SEQ ID NO:313) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do fragmento U de PDC6. O fragmento U de PDC6 foi amplificado com o iniciador oBP444 (SEQ ID NO:314) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do fragmento B de PDC6 e iniciador oBP445 (SEQ ID NO:315) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do fragmento C de PDC6. O fragmento C de PDC6 foi amplificado com o iniciador oBP446 (SEQ ID NO:316) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do fragmento U de PDC6 e iniciador oBP447 (SEQ ID NO:317). Os produtos de PCR foram purificados com um kit de Purificação de PCR (Qiagen). O fragmento AB de PDC6 foi criado pela sobreposição de PCR pela mistura de fragmento A de PDC6 e fragmento B de PDC6 e amplificação com Iniciadores oBP440 (SEQ ID NO:310) e oBP443 (SEQ ID NO:313). O fragmento UC de PDC6 foi criado pela sobreposição de PCR pela mistura de fragmento U de PDC6 e fragmento C de PDC6 e amplificação com Iniciadores oBP444 (SEQ ID NO:314) e oBP447 (SEQ ID NO:317). Os produtos de PCR resultantes foram purificados em um

gel de agarose seguido por um Kit de Extração de Gel (Qiagen). O cassete ABUC de PDC6 foi criado pela sobreposição de PCR pela mistura de fragmento AB de PDC6 e fragmento UC de PDC6 e amplificação com Iniciadores oBP440 (SEQ ID NO:310) e oBP447 (SEQ ID NO:317). O produto de PCR foi purificado com um kit de Purificação de PCR (Qiagen).

[0449] As células competentes de CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3 foram feitas e transformadas com o Cassete ABUC de PDC6 de PCR pelo uso de um Kit de Transformação de Levedura Frozen-EZ II (Zymo Research). As misturas de transformação foram plaqueadas em meios totalmente sintéticos sem uracila suplementados com 2% de glicose a 30 °C. Os transformantes com um nocaute de pdc6 foram submetidos à triagem por PCR com Iniciadores oBP448 (SEQ ID NO:318) e oBP449 (SEQ ID NO:319) pelo uso de DNA genômico preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). Um transformante correto foi selecionado como a cepa CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6::URA3.

[0450] A CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6::URA3 foi cultivada durante a noite em YPD e plaqueada em meio completamente sintético que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1 %) a 30 °C para selecionar isolados que perderam o marcador URA3. A deleção e remoção de marcador foram confirmadas pelo PCR e sequenciamento com Iniciadores oBP448 (SEQ ID NO:318) e oBP449 (SEQ ID NO:319) pelo uso de DNA genômico preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). A ausência do gene PDC6 do isolado foi demonstrada por um resultado PCR negativo pelo uso de Iniciadores específicos para a sequência de codificação de PDC6, oBP554 (SEQ ID NO:320) e oBP555 (SEQ ID NO:321). O isolado correto foi selecionado como a cepa CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6 e designado como BP891.

**DELEÇÃO DE PDC1 E INTEGRAÇÃO DE ILVDSM**

[0451] O gene PDC1 foi deletado e substituído com a região de codificação *ilvD* de *Streptococcus mutans* ATCC nº. 700610. O fragmento A seguido pela região de codificação *ilvD* de *Streptococcus mutans* para o Cassete de PCR para a deleção de PDC1 e integração de *ilvDSm* foi amplificado pelo uso de Mistura Mestre PCR de Alta Fidelidade Phusion (New England BioLabs) e DNA genômico NYLA83 como modelo preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). O NYLA83 é uma cepa que carrega a deleção de PDC1 e integração de *ilvDSm* descritas na Publicação de Pedido de Patente nº US2009/0305363 que é incorporada inteiramente ao presente documento a título de referência. O fragmento A-*ilvDSm* de PDC1 (SEQ ID NO:322) foi amplificado com o iniciador oBP513 (SEQ ID NO:326) e o iniciador oBP515 (SEQ ID NO:327) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do fragmento B de PDC1. Os fragmentos B, U e C para o Cassete de PCR para a deleção de PDC1 e integração de *ilvDSm* foram amplificados pelo uso de Mistura Mestre PCR de Alta Fidelidade Phusion (New England BioLabs) e DNA genômico CEN.PK 113-7D como modelo preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). O fragmento B de PDC1 foi amplificado com iniciador oBP516 (SEQ ID NO:328) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do fragmento A-*ilvDSm* de PDC1 e iniciador oBP517 (SEQ ID NO:329) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do fragmento U de PDC1. O fragmento U de PDC1 foi amplificado com iniciador oBP518 (SEQ ID NO:330) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do fragmento B de PDC1 e iniciador oBP519 (SEQ ID NO:331) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do fragmento C de PDC1. O fragmento C de PDC1 foi amplificado com iniciador oBP520 (SEQ ID NO:332) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do fragmento U de PDC1 e

iniciador oBP521 (SEQ ID NO:333). Os produtos de PCR foram purificados com um kit de Purificação de PCR (Qiagen). O fragmento A-ilvDSm-B de PDC1 foi criado pela sobreposição por PCR pela mistura de fragmento A-ilvDSm de PDC1 e fragmento B de PDC1 e amplificação com Iniciadores oBP513 (SEQ ID NO:326) e OBP517 (SEQ ID NO:329). O fragmento UC de PDC1 foi criado pela sobreposição por PCR pela mistura de fragmento U de PDC1 e fragmento C de PDC1 e amplificação com Iniciadores oBP518 (SEQ ID NO:330) e oBP521 (SEQ ID NO:333). Os produtos de PCR resultantes foram purificados em um gel de agarose seguido por um Kit de Extração de Gel (Qiagen). O cassete PDC1 A-ilvDSm-BUC (SEQ ID NO:323) foi criado pela sobreposição por PCR pela mistura de fragmento A-ilvDSm-B de PDC1 e fragmento UC de PDC1 e amplificação com Iniciadores oBP513 (SEQ ID NO:326) e oBP521 (SEQ ID NO:333). O produto de PCR foi purificado com um kit de Purificação de PCR (Qiagen).

[0452] As células competentes de CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdcc6 foram feitas e transformadas com o cassete de PDC1 A-ilvDSm-BUC de PCR pelo uso de um Kit de Transformação de Levedura Frozen-EZ II (Zymo Research). As misturas de transformação foram plaqueadas em meios totalmente sintéticos sem uracila suplementados com 2% de glicose a 30 °C. Os transformantes com um nocaute de pdc1 e integração de ilvDSm foram submetidos à triagem por PCR com Iniciadores OBP511 (SEQ ID NO:336) e oBP512 (SEQ ID NO:337) pelo uso de um DNA genômico preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). Uma ausência do gene PDC1 do isolado foi demonstrada por um resultado de PCR negativo pelo uso de Iniciadores específicos para a sequência de codificação de PDC1, OBP550 (SEQ ID NO:338) e oBP551 (SEQ ID NO:339). Um transformante correto foi selecionado como a cepa CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdcc6  $\Delta$ pdcc1::ilvDSm-URA3.

[0453] A cepa CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6  $\Delta$ pdc1::ilvDSm-URA3 foi cultivada durante a noite em YPD e plaqueada em meio completamente sintético que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1 %) a 30 °C para selecionar por isolados que perderam o marcador URA3. A deleção de PDC1, integração de ilvDSm e remoção de marcador foram confirmadas por PCR e sequenciamento com Iniciadores oBP511 (SEQ ID NO:336) e oBP512 (SEQ ID NO:337) pelo uso de DNA genômico preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). O isolado correto foi selecionado como a cepa CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6  $\Delta$ pdc1::ilvDSm e designado como BP907.

#### **DELEÇÃO DE PDC5 E INTEGRAÇÃO DE SADB**

[0454] O gene PDC5 foi deletado e substituído com a região de codificação de sadB de *Achromobacter xylosoxidans* (o gene sadB é descrito no Pedido de Patente nº US2009/0269823 que é incorporado inteiramente ao presente documento a título de referência). Um segmento do Cassete de PCR para a deleção de PDC5 e integração de sadB foi clonado primeiro no plasmídeo pUC19-URA3MCS.

[0455] O pUC19-URA3MCS é com base em pUC19 e contém a sequência do gene URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* situada dentro de um sítio de clonagem múltipla (MCS). O pUC19 contém o replicão pMB1 e uma codificação de gene para beta-lactamase para réplica e seleção no *Escherichia coli*. Além da sequência de codificação para URA3, as sequências a montante e a jusante deste gene foram incluídas para expressão do gene URA3 em levedura. O vetor pode ser usado para fins de clonagem e pode ser usado como um vetor de integração de levedura.

[0456] O DNA que abrange a região de codificação URA3 junto com 250 bp a montante e 150 bp a jusante da região de codificação URA3 de DNA genômico CEN.PK 113-7D de *Saccharomyces cerevisiae* foi amplificado

com Iniciadores oBP438 (SEQ ID NO:334), que contém sítios de restrição BamHI, Ascl, PmeI e FseI e oBP439 (SEQ ID NO:335), que contém Sítios de restrição XbaI, PacI e NotI pelo uso da Mistura Mestre PCR de Alta Fidelidade Phusion (New England BioLabs). O DNA genômico foi preparado pelo uso de um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). O produto de PCR e pUC19 (SEQ ID NO:325) foi ligado com DNA ligase T4 após digestão com BamHI e XbaI para criar um vetor pUC19-URA3MCS. O vetor foi confirmado por PCR e sequenciamento com Iniciadores oBP264 (SEQ ID NO:342) e oBP265 (SEQ ID NO:343).

[0457] A sequência de codificação de sadB e fragmento B de PDC5 foram clonados em pUC19-URA3MCS para criar a porção sadB-BU do cassete PDC5 A-sadB-BUC de PCR. A sequência de codificação de sadB foi amplificada pelo uso de pLH468-sadB (SEQ ID NO:359) como modelo com iniciador oBP530 (SEQ ID NO:344) que contém um sítio de restrição Ascl e iniciador oBP531 (SEQ ID NO:345) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do fragmento B de PDC5. O fragmento B de PDC5 foi amplificado com iniciador oBP532 (SEQ ID NO:346) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' de sadB e iniciador oBP533 (SEQ ID NO:347) que contém um sítio de restrição de PmeI. Os produtos de PCR foram purificados com um kit de Purificação de PCR (Qiagen). O sadB-fragmento B de PDC5 foi criado pela sobreposição por PCR pela mistura do sadB e fragmento B de PDC5 de produtos de PCR e amplificação com Iniciadores oBP530 (SEQ ID NO:344) e oBP533 (SEQ ID NO:347). O produto de PCR resultante foi digerido com Ascl E PmeI e ligado com DNA ligase T4 nos sítios correspondentes de pUC19-URA3MCS após digestão com as enzimas apropriadas. O plasmídeo resultante foi usado como um modelo para amplificação de sadB-Fragmento B-Fragmento U pelo uso de Iniciadores oBP536 (SEQ ID

NO:348) e oBP546 (SEQ ID NO:349) que contêm uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' de fragmento C de PDC5. O fragmento C de PDC5 foi amplificado com iniciador oBP547 (SEQ ID NO:350) que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' do sadB-Fragmento B-Fragmento U de PDC5 e iniciador oBP539 (SEQ ID NO:351). Os produtos de PCR foram purificados com um kit de Purificação de PCR (Qiagen). O sadB-Fragmento B-Fragmento U-Fragmento C de PDC5 foi criado pela sobreposição por PCR pela mistura de sadB-Fragmento B- Fragmento U de PDC5 e fragmento C de PDC5 e amplificação com Iniciadores oBP536 (SEQ ID NO:348) e oBP539 (SEQ ID NO:351). O produto de PCR resultante foi purificado em um gel de agarose seguido por um Kit de Extração de Gel (Qiagen). O cassete PDC5 A-sadB-BUC (SEQ ID NO:324) foi criado pela amplificação de sadB-Fragmento B-Fragmento U-Fragmento C de PDC5 com Iniciadores oBP542 (SEQ ID NO:352) que contêm uma extremidade 5' com homologia aos 50 nucleotídeos imediatamente a jusante da sequência de codificação PDC5 nativa e oBP539 (SEQ ID NO:351). O produto de PCR foi purificado com um Kit de Purificação de PCR (Qiagen).

[0458] As células competentes de CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdcc6  $\Delta$ pdcc1::ilvDSm foram feitas e transformadas com o cassete PDC5 A-sadB-BUC de PCR pelo uso de um Kit de Transformação de Levedura Frozen-EZ II (Zymo Research). As misturas de transformação foram plaqueadas em meios totalmente sintéticos sem uracila suplementados com 1 % de etanol (sem glicose) a 30C. Os Transformantes com um nocaute de pdcc5 e integração sadB foram submetidos à triagem por PCR com Iniciadores oBP540 (SEQ ID NO:353) e oBP541 (SEQ ID NO:354) pelo uso de DNA genômico preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). Uma ausência do gene PDC5 do isolado foi demonstrada por um resultado de



PCR negativo pelo uso de Iniciadores específicos para a sequência de codificação de PDC5, oBP552 (SEQ ID NO:355) e oBP553 (SEQ ID NO:356). Um transformante correto foi selecionado como a cepa CEN.PK US- ZD  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6  $\Delta$ pdc1::ilvDSm Apdc5::sadB-URA3.

[0459] A CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6  $\Delta$ pdc1::ilvDSm Apdc5::sadB-URA3 foi cultivada durante a noite em YPE (1 % de etanol) e plaqueada em meio completamente sintético suplementado com etanol (sem glicose) e que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1%) a 30 °C para selecionar isolados que perderam o marcador URA3. A deleção de PDC5, integração de sadB e remoção de marcador foram confirmadas por PCR com Iniciadores oBP540 (SEQ ID NO:353) e oBP541 (SEQ ID NO:354) pelo uso de DNA genômico preparado com um Kit Bact/de Levedura Puregene Gentra (Qiagen). O isolado correto foi selecionado como cepa CEN.PK 113-7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6  $\Delta$ pdc1::ilvDSm Apdc5::sadB e designado como BP913.

### **DELEÇÃO DE GPD2**

[0460] Para deletar a região de codificação GPD2 endógena, um cassete gpd2::loxP- URA3-loxP (SEQ ID NO:361) foi amplificado por PCR pelo uso de loxP- URA3-loxP PCR (SEQ ID NO:360) como DNA modelo. O loxP- URA3-loxP contém o marcador URA3 de (ATCC nº 77107) dividido por sítios de loxP recombinase. O PCR foi feito pelo uso de DNA polimerase de Phusion e Iniciadores LA512 e LA513 (SEQ ID NOs:340 e 341). A porção de GPD2 de cada iniciador foi derivada a partir da região 5' a jusante da Região de codificação GPD2 e região 3' a jusante da região de codificação de forma que a integração do marcador loxP-URA3-loxP resultou na substituição da região de codificação GPD2. O produto de PCR foi transformado no BP913 e transformantes foram selecionados em meios totalmente sintéticos sem uracila suplementados com 1% de etanol (sem glicose). Os transformantes foram

submetidos à triagem para verificar integração correta por PCR pelo uso de Iniciadores oBP582 e AA270 (SEQ ID NOs:357 e 358).

[0461] O marcador URA3 foi reciclado pela transformação com pRS423::PGAL1-cre (SEQ ID NO:271) e plaqueamento em meios totalmente sintéticos sem histidina suplementados com 1 % de etanol a 30 °C. Os transformantes foram marcados com listras em meio completamente sintético suplementado com 1 % de etanol e que contém ácido 5-fluoro-orótico (0,1%) e incubado a 30 °C para selecionar isolados que perderam o marcador URA3. Os isolados resistentes a 5-FOA foram cultivados em YPE (1 % de etanol) para remoção do plasmídeo pRS423::PGAL1-cre. A deleção e remoção de marcador foram confirmadas por PCR com Iniciadores oBP582 (SEQ ID NO:357) e oBP591 (SEQ ID NO:362). O isolado correto foi selecionado como cepa CEN.PK 113- 7D  $\Delta$ ura3::loxP  $\Delta$ his3  $\Delta$ pdc6  $\Delta$ pdc1::ilvDSm  $\Delta$ pdc5::sadB  $\Delta$ gpd2::loxP e designado como BP1064 (PNY1503).

### **EXEMPLO 13**

#### **CONSTRUÇÃO DE PNY2204 E PLASMÍDEOS DE VIA DE ISOBUTANOL**

[0462] A finalidade desse exemplo é descrever a construção de um vetor para permitir a integração de um gene que codifica sintase de acetolactato na região intergênica de ocorrência natural entre as sequências de codificação PDC1 e TRX1 no Cromossomo XII. As cepas que resultam do uso deste vetor também são descritas.

#### **CONSTRUÇÃO DE VETOR DE INTEGRAÇÃO PUC19-KAN::PDC1::FBA-ALS::TRX1**

[0463] O cassete FBA-alsS-CYCt foi construído pelo movimento do fragmento BbvCI/PacI 1,7 kb de pRS426::GPD::alsS::CYC (descrito na Patente nº US 7.851.188 que é incorporada inteiramente ao presente documento a título de referência) a pRS426::FBA::ILV5::CYC (descrito na Patente nº US 7.851.188 que é incorporada inteiramente ao presente documento a título de referência) que foi digerida previamente com BbvCI/PacI

para liberar o gene ILV5. As reações de ligação foram transformadas em células TOP10 de *E. coli* e transformantes foram submetidos à triagem pelo PCR que usa Iniciadores N98SeqF1 (SEQ ID NO:363) e N99SeqR2 (SEQ ID NO:365). O cassete FBA-alsS-CYCt foi isolado do vetor que usa BglII e NotI para clonagem em pUC19-URA3::ilvD-TRX1 (clone "B") no sítio AflII (fragmento de Klenow foi usado para tornar as terminações compatíveis para ligação). Os transformantes que contêm o cassete alsS em ambas as orientações no vetor foram obtidos e confirmados por PCR pelo uso de Iniciadores N98SeqF4 (SEQ ID NO:364) e N1111 (SEQ ID NO:366) para a configuração "A" e N98SeqF4 (SEQ ID NO:364) e N1110 (SEQ ID NO:367) para a configuração "B". Uma versão de geneticina selecionável do vetor de configuração "A" foi, então, feita pela remoção do gene URA3 (fragmento de *NotI*/*NaeI* de 1,2 kb) e adição de um cassete de geneticina. O fragmento de Klenow foi usado para tornar todas as terminações compatíveis para ligação e os transformantes foram submetidos à triagem por PCR para selecionar um clone com o gene de resistência a geneticina na mesma orientação que o marcador URA3 anterior pelo uso de Iniciadores BK468 (SEQ ID NO:368) e N160SeqF5 (SEQ ID NO:210). O clone resultante foi chamado de pUC19-kan::pdc1::FBA-alsS::TRX1 (clone A) (SEQ ID NO:387).

### **CONSTRUÇÃO DE CEPAS INTEGRANTES DE ALSS E DERIVADOS PRODUTORES DE**

#### **ISOBUTANOL**

[0464] O vetor de integração pUC19-kan::pdc1::FBA-alsS descrito acima foi linearizado com *PmeI* e transformado no PNY1507 (Exemplo 8). O *PmeI* corta o vetor dentro da região intergênica pdc1-TRX1 clonada e, portanto, leva a integração almejada naquela localização (Rodney Rothstein, *Methods in Enzymology*, 1991, volume 194, páginas 281 a 301). Os transformantes foram selecionados em YPE mais 50 µg/ml de G418. Os transformantes remendados foram submetidos à triagem por PCR para o evento de integração pelo uso de

Iniciadores N160SeqF5 (SEQ ID NO:210) e oBP512 (SEQ ID NO:337). Dois transformantes foram testados indiretamente para função de sintase de acetolactato pela avaliação da capacidade das cepas de fazer isobutanol. Para fazer isso, genes de via de isobutanol adicionais foram supridos em vetores de transferência de levedura de *E. coli* (pYZ090 $\Delta$ alsS e pBP915 descritos acima). Um clone foi designado como PNY2205. A cepa parente livre de plasmídeo foi designada como PNY2204 (MATa ura3 $\Delta$ ::loxP his3 $\Delta$  pdc6 $\Delta$  pdc1 $\Delta$ ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t- pUC19-loxP-kanMX-loxP-P[FBA1]-ALS|alsS\_Bs-CYC1t pdc5 $\Delta$ ::P[PDC5]- ADH|sadB\_Ax-PDC5t gpd2 $\Delta$ ::loxP fra2 $\Delta$  adh1 $\Delta$ ::UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_LI(y)-ADH1t).

#### **PLASMÍDEOS DE VIA DE ISOBUTANOL (PYZ090 $\Delta$ ALS E PBP915)**

[0465] O pYZ090 (SEQ ID NO: 195) foi digerido com *SpeI* e *NotI* para remover a maior parte do promotor CUP1 e toda a sequência de codificação *alsS* e terminador CYC. O vetor foi, então, autoligado após tratamento com fragmento de Klenow e transformado em células Stbl3 de *E. coli* que selecionam pela resistência à ampicilina. A remoção da região de DNA foi confirmada para dois clones independentes por sequenciamento de DNA pela junção de ligação por PCR pelo uso de iniciador N191 (SEQ ID NO:370). O plasmídeo resultante foi denominado pYZ090 $\Delta$ alsS (SEQ ID NO,371). O plasmídeo pLH468 foi construído para a expressão de DHAD, KivD e HADH em levedura. O pBP915 (SEQ ID NO: 182) foi construído a partir do pLH468 (SEQ ID NO: 139) pela deleção do gene *KivD* e dos pares de base 957 do promotor *TDH3* a montante de *kivD*. O pLH468 foi digerido com *SwaI* e o fragmento grande (12896 bp) foi purificado em um gel de agarose seguido por um Kit de Extração de Gel (Qiagen; Valencia, CA). O fragmento isolado de DNA foi autoligado com DNA ligase T4 e usado para transformar o TOP10 eletrocompetente de *Escherichia coli* (Invitrogen; Carlsbad, CA). Os plasmídeos de transformantes foram isolados e verificados para a deleção apropriada por

análise de restrição com a enzima de restrição SwaI. Os isolados também foram sequenciados pelo sítio de deleção com Iniciadores oBP556 (SEQ ID NO:372) e oBP561 (SEQ ID NO:373). Um clone com a deleção apropriada foi designado como pBP915 (pLH468ΔKivD) (SEQ ID NO:182).

[0466]O pYZ090 é com base na cadeia principal do pHR81 (ATCC nº-87541, Manassas, VA). O pYZ090 foi construído para conter um gene quimérico que tem a região de codificação do gene *alsS* de *Bacillus subtilis* (posição nt 457-2172) expressa a partir do promotor CUP1 de levedura (nt 2-449) e seguido pelo terminador CYC1 (nt 2181-2430) para expressão de ALS e um gene quimérico que tem a região de codificação do gene *ilvC* de *Lactococcus lactis* (nt 3634-4656) expressa a partir do promotor ILV5 de levedura (2433-3626) e seguido pelo terminador ILV5 (nt 4682-5304) para expressão de KARI.

#### **EXEMPLO 14**

##### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL-PNY1910 E PNY2242**

Métodos:

##### **PREPARO DE MEIO INÓCULO**

[0467] 1 l de meio inóculo continha: 6,7 g de Base de Nitrogênio de Levedura sem aminoácidos (Difco 0919-15-3); 2,8 g de Suplemento de Meio de Retirada Sintética de Levedura Sem Histidina, Leucina, Triptofano e Uracila (Sigma Y2001); 20 ml de 1 % (w/v) de L-Leucina; 4 ml de 1 % (w/v) de L-Triptofano; 3 g de etanol; 10 g de glicose.

##### **PREPARO DE MEIO DE FERMENTAÇÃO DEFINIDO**

[0468]O volume de caldo após inoculação era de 800 ml com a seguinte composição final por litro: 5 g de sulfato de amônia, 2,8 g de fosfato de potássio monobásico, 1,9 g de septahidrato de sulfato de magnésio, 0,2 ml de antiespuma (Sigma DF204), Suplemento de Meio de Retirada Sintético de Levedura sem Histidina, Leucina, Triptofano e Uracila (Sigma Y2001), 16 mg

de L-leucina, 4 mg de L-triptofano, 6 ml de uma mistura de vitaminas (em 1 l de água, 50 mg de biotina, 1 g de Ca-pantotenato, 1 g de ácido nicotínico, 25 g de mio-inositol, 1 g de hidrocloreto de cloreto de tiamina, 1 g de hidrocloreto de piridoxol, 0,2 g de ácido p-aminobenzoico) 6 ml de um traço de solução mineral (em 1 l de água, 15 g de EDTA, 4,5 g de heptahidrato de sulfato de zinco, 0,8 g de cloreto de manganês desidratado, 0,3 g de hexahidrato de cloreto de cobalto, 0,3 g de pentahidrato de sulfato de cobre, 0,4 g de molibdênio dissódio desidratado, 4,5 g de dihidrato de cloreto de cálcio, 3 g de heptahidrato de sulfato de ferro, 1 g de ácido bórico, 0,1 g de iodeto de potássio), 30 mg de tiamina HCl, 30 mg de ácido nicotínico. O pH foi ajustado para 5,2 com 2N KOH e glicose adicionados a 10 g/l.

#### **PREPARO DE INÓCULO**

[0469] Um frasco de agitação de 125 ml foi inoculado diretamente de um recipiente congelado pela pipetagem da cultura de recipiente inteira (aproximadamente 1 ml) em 10 ml do meio inóculo. O frasco foi incubado a 260 rpm e 30 °C. A cepa foi cultivada durante a noite até OD a cerca de 1,0. O OD a  $\lambda = 600$  nm foi determinado em um espectrofotômetro de Beckman (Beckman, USA).

#### **PROJETO EXPERIMENTAL DE BIORREATOR**

[0470] As fermentações foram executadas em 1 l de agente de fermentação Biostat B DCU3 (Sartorius, USA) com um volume eficaz em 0,8 l. Uma composição fora de gás foi monitorada por um espectrômetro Prima DB (Thermo Ejection Corp., USA). A temperatura foi mantida a 30 °C e o pH controlado a 5,2 com 2N KOH por toda a fermentação. Diretamente após a inoculação com 80 ml do inóculo, o dO foi controlado pela agitação a 30%, o pH foi controlado a 5,25, a aeração foi controlada a 0,2 l/min. Uma vez que OD de aproximadamente 3 foi alcançado, o gás foi trocado para N<sub>2</sub> para cultivo

anaeróbico. Por toda a fermentação, a glicose foi mantida em excesso (5-20 g/L) pelas adições manuais de uma solução de 50 % (w/w).

### **MÉTODOS PARA ANALISAR EXPERIMENTOS DE CULTIVO**

[0471] O OD a  $\lambda = 600$  nm foi determinado em um espectrofotômetro pela pipetagem de uma amostra de caldo bem misturada em um crisol (CS500 VWR International, Alemanha). Se a concentração de biomassa da amostra excedeu a faixa de absorção linear do espectrofotômetro (normalmente valores OD de 0,000 a 0,300), a amostra foi diluída com 0,9% de solução de NaCl para reder valores na faixa linear.

[0472] As medições de glicose, isobutanol e outros subprodutos de fermentação na cultura sobrenadante foram executadas por HPLC pelo uso de uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA) com índice refrativo (RI) e detectores de arranjo de diodo (210 nm). A separação cromatográfica foi alcançada pelo uso de 0,01 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como a fase móvel com uma taxa de fluxo de 0,6 ml/min e uma temperatura de coluna de 40 °C. O tempo de retenção de isobutanol é de 32,2 minutos sob essas condições. A concentração de isobutanol em amostras sem gás foi determinada pelo espectrômetro de massa.

### **RESULTADOS**

[0473] A concentração de biomassa máxima medida como densidade óptica (OD), taxa volumétrica de produção de isobutanol, titulação de isobutanol final e rendimento de isobutanol em glicose estão presentes na tabela abaixo. A cepa PNY2242 tinha maiores titulações e taxas mais rápidas que a cepa PNY1910 e produziu isobutanol com maior taxa específica e titulação. As taxas específicas são mostradas na Figura 5. O acúmulo do DHIV + DHMB na cultura sobrenadante foi três vezes maior com PNY1910 em comparação à cepa PNY2242 (Figura 6). O rendimento de glicerol, ácido

pirúvico, BDO, DHIV+DHMB\*, aKIV e ácido isobutírico em glicose é mostrado na Figura 7.

\*DHIV analisado pelo método HPLC inclui tanto DHIV quanto DHMB.

**TABELA 19**

Cepa	Máximo em OD600	Taxa (g/l/h)	Titulação (g/l)	Rendimento g/g
PNY1910	5,0	0,16	10,9	0,25
PNY2242	5,0	0,23	16,1	0,27

**EXEMPLO 15**

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA PCR SUJEITA A ERRO K9G9**

[0474] A PCR sujeita a erros de K9G9 foi realizada para gerar uma biblioteca pode ser submetida à triagem para variantes com aumentos nos valores Km para NADPH relacionado à NADH. O PCR mutagênica de K9G9 foi realizada com o Kit de Mutagênese de Domínio GeneMorph® II EZClone (nº de catálogo 200552; Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, CA). Os Iniciadores K9G9\_EZ\_F1 (AAA CAT GGA AGA ATG TAA GAT GGC; SEQ ID NO: 390) e K9G9\_EZ\_R1 (TCA GTT GTT AAT CAA CTT GTC TTC G; SEQ ID NO: 391) foram sintetizados comercialmente pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville IA). Diferente dos Iniciadores, modelo e ddH<sub>2</sub>O, reagentes usados aqui foram supridos com o kit indicado acima. A mistura de PCR mutagênica consistiu de 4 µl de pHR81-PIIv5-KARI-K9.G9 (SEQ ID NO: 392) (770 µg/pg), 1,25 µl de cada iniciador (provisões de 100 ng/µl), 5 µl de tampão de reação 10x Mutazyme II, 1 µl de 40 mM mistura de dNTP, 1,5 µl de DNA polimerase Mutazyme II e 36 µl de ddH<sub>2</sub>O. As seguintes condições foram usadas para a reação PCR: A temperatura inicial era 95 °C por 2,0 min seguido por 30 ciclos de aquecimento/esfriamento. Cada ciclo consistiu de 95 °C por 30 seg, 48 °C por 30 seg e 72 °C por 2,0 min. Ao término da ciclagem de temperatura, a amostra foi mantida a 72 °C por mais 10,0 min e, então, mantida no aguardo da recuperação de amostra a 4 °C. O



produto de reação foi separado do modelo através de eletroforese de gel de agarose (1 % de agarose, tampão 1X TBE) e recuperado pelo uso do Kit de Extração de Gel de DNA StrataPrep® (nº de catálogo 400766, Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, CA) conforme recomendado pelo fabricante.

[0475] O produto de reação isolado foi empregado como um megainiciador para gerar bibliotecas de gene na "reação de EZClone" do kit indicado acima. Ao contrário do megainiciador, modelo e ddH<sub>2</sub>O, os reagentes usados aqui foram supridos com o kit indicado acima. A reação consistiu de 25 µl da mistura de enzima 2\* EZClone, 4 µl de megainiciador (125 ng/µl), 2 µl de K9G9 em um vetor pBAD.KARI (25 ng/µl), 3 µl de solução EZClone e 16 µl de ddH<sub>2</sub>O. As seguintes condições foram usadas para a reação: A temperatura inicial foi 95 °C por 1,0 min seguido por 30 ciclos de aquecimento/esfriamento. Cada ciclo consistiu de 95 °C por 50 seg, 60 °C por 50 seg e 68 °C por 10,0 min. Ao término da ciclagem de temperatura, as amostras foram mantidas a 72 °C por mais 10,0 min e, então, mantidas no aguardo de recuperação de amostra a 4 °C. 1 µl do Dpn I (10 U/µl) foi adicionado e a mistura foi incubada por 4 horas a 37 °C.

[0476] 4 µl do produto "reação de EZClone" digerido com Dpn I foram, então, transformados em 50 µl de células de *E. coli* ultracompetentes XL10-Gold® (fornecidas no Kit de Mutagênese de Domínio GeneMorph® II EZClone) conforme recomendado pelo fabricante. Os transformantes foram espalhados em placas de ágar que contêm o meio LB e 100 µg/ml de ampicilina (nº de catálogo L1004, Teknova Inc. Hollister, CA) incubado a 37 °C durante a noite e armazenar a 4 °C. Essas etapas foram repetidas com 4 µl de digerido em Dpn I de produto de "reação de EZClone" e 50 µl de células por transformação para um total de 10 transformações. A biblioteca resultante em XL-Gold foi escovada das

placas de ágar com uma solução que contém sais M9, combinada, diluída em meios que contêm o meio LB me 100 µg/ml de ampicilina e incubada a 37 °C durante a noite. A biblioteca de DNA foi isolada das células com o Kit de Minipreparo por revolução QIAprep (nº de catálogo 2706; Qiagen, Valencia, CA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A biblioteca amplificada foi, então, usada para transformar uma cepa eletrocompetente de *E. coli* Bw25113 ( $\Delta$ ilvC) pelo uso de um BioRad Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Os clones transformados foram espalhados em placas de ágar que contêm o meio LB e 100 µg/ml de ampicilina (nº 101320-154, Teknova Inc. Hollister, CA) e incubados a 37 °C durante a noite. Os clones foram empregados para triagem de alto desempenho conforme descrito no Exemplo 16.

### **EXEMPLO 16**

#### **IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DE K9G9 COM $K_M$ AUMENTADO PARA NADPH**

#### **ATRAVÉS DE TRIAGEM POR INIBIÇÃO DE NADP<sup>+</sup> DIMINUÍDA DA ATIVIDADE DE NADH**

[0477]A biblioteca K9G9 descrita no Exemplo 15 foi submetida à triagem para variantes com inibição de NADP<sup>+</sup> reduzida de atividade de KARI dependente de NADH. Uma variante de K9G9 com inibição de NADP<sup>+</sup> reduzida da atividade com NADH pode potencialmente exibir um aumento na razão do  $K_M$  para NADPH ao  $K_M$  para NADH. Com um objetivo específico de aumentar o  $K_M$  para NADPH em relação ao  $K_M$  para NADH, os acertos da triagem foram parcialmente purificados e análises cinéticas foram realizadas para determinar parâmetros  $V_{max}$  e  $K_M$  com NADH e com NADPH.

#### **ENSAIO DE TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO DE BIBLIOTECA DE GENE K9G9**

[0478]A triagem de alto desempenho das bibliotecas de gene de enzimas KARI mutantes foi realizada conforme descrito no presente documento: 10<sup>x</sup> meio de congelamento que contém 554,4 g/L de glicerol, 68 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM de MgSO<sub>4</sub>, 17 mM de citrato de sódio, 132 mM de

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 36 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  foram preparados com água pura molecular e esterilizados com filtro. O meio de congelamento foi preparado pela diluição do 10x meio de congelamento com o meio LB. Uma alíquota (200  $\mu\text{l}$ ) do 1x meio de congelamento foi usada para cada cavidade das placas de arquivamento de 96 cavidades (nº de categoria 3370, Corning Inc. Corning, NY).

[0479] Os clones das placas de ágar LB foram selecionados e inoculados nas placas de arquivamento de 96 cavidades que contêm o meio de congelamento e cultivados durante a noite a 37 °C sem agitação. As placas de arquivamento foram, então, armazenadas a -80 °C. A cepa de *E. coli* Bw25113( $\Delta\text{ilvC}$ ), conforme descrito na Patente nº US 8.129.162, transformada com pBAD-HisB (Invitrogen) sempre foi usada como o controle negativo. O controle positivo para a biblioteca foi K9G9-KARI na cepa de *E. coli* Bw25113 ( $\Delta\text{ilvC}$ ) conforme descrito na Patente nº US 8.129.162.

[0480] Os clones das placas de arquivamento foram inoculados nas placas de 96 cavidades profundas. Cada cavidade continha 3,0  $\mu\text{l}$  de células de placas de arquivamento descongeladas, 200  $\mu\text{l}$  do meio LB que contém 100 g/ml de ampicilina e 0,02 % (w/v) de arabinose como o indutor. As células foram cultivadas durante a noite a 37 °C com 80% de umidade enquanto eram agitadas (900 rpm), colhidas por centrifugação (3.750 rpm, 5 min a 25 °C). (Centrífuga de Eppendorf, Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY) e a pélete de célula foi armazenada a -20 °C para análise posterior.

[0481] O substrato de ensaio, (*R,S*)-acetolactato, foi sintetizado conforme descrito por Aulabaugh e Schloss (Aulabaugh and Schloss, Biochemistry, 29: 2824 a 2830, 1990). Todas as outras substâncias químicas usadas no ensaio foram compradas da Sigma. A conversão enzimática de acetolactato para  $\alpha,\beta$ -dihidroxiisovalerato por KARI foi seguida pela medição da oxidação do cofator, NADH, da reação a 340 nm pelo uso de um leitor de placa

(Sapphire 2, Tecan, Männedorf, Suíça). A atividade foi calculada pelo uso do coeficiente de extinção molar de  $6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  de NADH.

[0482] O pélete de célula congelada em placas de cavidade profunda e BugBuster (Novagen 71456, Darmstadt, Alemanha) foram aquecidos até a temperatura ambiente por 30 min ao mesmo tempo. 75  $\mu\text{l}$  de BugBuster a 50% (v/v em água) foram adicionados a cada cavidade após 30 min de aquecimento e células foram suspensas pelo uso de um agitador de placa. As placas com suspensão de pélete de célula/Bug Buster a 50% foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min. O lisato de célula diluído com 75  $\mu\text{l}$  d.d água, o que resulta em 0,5X lisato. Os ensaios dos extratos livres de célula diluídos foram realizados a  $30^\circ\text{C}$  em tampão que contém 2,4 mM de (R/S)-acetolactato, 100 mM de HEPES de pH 6,8, 100 mM de KCl, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 150  $\mu\text{M}$  de NADH, 12,5  $\mu\text{l}$  de 0,5 X lisato de célula com ou sem 2,5 mM de  $\text{NADP}^+$ .

#### **IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DE K9G9 COM INIBIÇÃO DE $\text{NADP}^+$ REDUZIDA DE ATIVIDADE DE KARI DE NADH**

[0483] A razão para a taxa de oxidação medida de NADH na presença de  $\text{NADP}^+$  para a taxa medida de oxidação de NADH em uma ausência de  $\text{NADP}^+$  foi calculada para cada variante e cavidade de controle positivo (2 por placa). A média e desvio padrão das razões para todas as cavidades de controle positivo (total de 104) foram calculadas.

[0484] Uma cavidade de variante foi considerada para conter um acerto inicial se a taxa em uma ausência de  $\text{NADP}^+$  foi maior que 0,1 OD/hr e a razão de taxa foi tanto maior que 0,45 (três desvios padrões maiores que a média do controle positivo) quanto menor que 1. Um total de 521 acertos foram identificados de uma fonte de 4.607 variantes em potencial. Esses acertos iniciais foram consolidados, o que forma uma biblioteca menor para análise adicional.

### **TRIAGEM SECUNDÁRIA DE ACERTO DE BIBLIOTECA INICIAL**

[0485] A biblioteca de acerto consolidada foi cultivada em triplicata biológica e extratos livres de células foram preparados e ensaiados conforme descrito acima. A razão de taxas foi, então, calculada para as variantes e controles positivos conforme acima. Os acertos finais que foram selecionados para análise cinética detalhada correspondem aos seguintes critérios: a taxa em uma ausência de NADP<sup>+</sup> foi maior que 0,6 OD/hr, a razão de taxa foi maior que 0:51 e menor que 1 e pelo menos duas das três replicatas biológicas passaram pelos critérios. Dezesete acertos foram identificados para análise cinética e marcados com listras nas placas LB com 100 µg/ml de ampicilina adicionados.

### **ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE VARIANTES DE K9G9**

[0486] O sequenciamento de DNA das dezessete variantes identificadas a partir da triagem de HTS secundária foi alcançado pelo uso de TempliPhi(TM) (GE Healthcare) com os Iniciadores pBAD-For (ATGCCATAGCATTTTTATCC; SEQ ID NO: 393) e pBAD-Rev (CTGATTTAATCTGTATCAGGCT; SEQ ID NO: 394).

**TABELA 20. SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDO PARA VARIANTES DE K9G9**

Variante	Sequência	Substituições de aminoácido
878 C1	873	Nenhuma identificada
879 A7	874	K90M
879 C2	875	H37Q
880 A11	876	A182T, P320Q
880 B4	877	K57E
880 D11	878	K90M, A174V
881 A2	879	K90M, I133V, K282T
881 G3	880	Y53F, E74G
881 G9	881	K90E
882 B12	882	H118R
882 C10	883	G31S, R61S, C121Y, D129N, G183D
882 C7	933	E54G
882 F9	934	K90E, Q160H
882 G6	935	G55A
882 G12	936	V142L, S285Y
883 C4	937	A170V
883 G9	938	L197M, K310M

**ANÁLISE CINÉTICA DE PROTEÍNA DE VARIANTE PARCIALMENTE PURIFICADA**

[0487] A cepa Bw25113 de *E. coli* ( $\Delta$ ilvC), conforme descrito na Patente nº US 8.129.162, foi usada para expressar as dezessete variantes e controle positivo de K9G9. As cepas foram cultivadas por 8 horas em 10 ml de caldo de LB (nº 46-060-CM, Mediatech, Manassas, VA) que contém 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C com agitação em 125 ml de frascos com tampa filtrados ventilados do tipo balão. 200 l desta cultura foram usados para inocular 100 ml caldo de LB com 100 µg/ml de ampicilina e 0,2 % (w/v) de arabinose adicionados. Essas culturas foram cultivadas por 16 a 18 horas a 37 °C com agitação em frascos de 500 ml com tampa filtrados ventilados do tipo balão. As células foram colhidas em uma alíquota de 20 ml e duas alíquotas de 40 ml, sobrenadantes foram decantados e os péletes foram congelados a -80 °C.

[0488] Para purificar parcialmente a proteína, o pélete de célula que corresponde aos 20 ml de colheita de cultura de célula foi descongelado e ressuspenso em 1 ml de Mistura Mestre de Bug Buster (Novagen 71456, Darmstadt, Alemanha). A suspensão de célula foi incubada na temperatura ambiente por 15 minutos seguidos por 15 minutos de incubação a 60 °C para desnaturar as proteínas suscetíveis a calor. Os detritos de célula e proteínas desnaturadas foram peletizados por centrifugação por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante que contém a proteína citossólica termicamente estável que inclui K9G9 e variantes foi recuperado e armazenado a 4 °C.

[0489] A proteína total da fração de proteína citossólica termicamente estável foi medida pelo Ensaio de Bradford pelo uso de Coomassie Plus (Thermo Scientific nº 23238, Rockford, Ill.). BSA foi empregado como o padrão. A concentração de proteína foi medida pela determinação da absorvância a 595 nm pelo uso de um espectrofotômetro Cary 300 (Agilent Technologies, Wilmington, DE).

[0490] Para determinar valores  $V_{\max}$  e  $K_M$  valores para NADH e NADPH, as proteínas parcialmente purificadas foram ensaiadas em várias concentrações de NADH (0, 16,4, 32,8, 65,7, 98,5, 164,3 e 246,5  $\mu\text{M}$ ) e de NADPH (0, 12,8, 25,6, 51,2, 76,8 e 128  $\mu\text{M}$ ). Os ensaios foram conduzidos a 30 °C em 100 mM de HEPES (pH 6,8), 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM de KCl e 4,8 mM de R/S- acetolactato. Entre 0,1 a 0,35 mg/ml de proteína total foram adicionados ao ensaio. A taxa de conversão de S-acetolactato para DHIV foi medida através de monitoramento da oxidação de NAD(P)H a 340 nm pelo uso de um espectrofotômetro Cary 300 (Agilent Technologies, Wilmington, DE). A atividade foi calculada pelo uso do coeficiente de extinção molar de  $6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Os valores de  $V_{\max}$  e  $K_m$  foram calculados pela plotagem de atividade específica (U/mg) pela concentração de cofator e os dados foram adequados à equação de Michaelis-Menten pelo uso do software Kaleidagraph (Synergy, Reading, PA).

**TABELA 21. VALORES CINÉTICOS PARA VARIANTES DE K9G9 PARCIALMENTE**

**PURIFICADAS DETERMINADAS ATRAVÉS DE ENSAIOS DE CONSUMO DE NAD(P)H**

Variante	$V_{\max}$ NADPH, U/mg	$K_m$ NADPH $\mu\text{M}$	$V_{\max}/K_m$ NADPH l/min*mg	$V_{\max}$ NADH, U/mg	$K_m$ NADH $\mu\text{M}$	$V_{\max}/K_m$ NADH l/min*mg
K9G9	1,53	45,5	0,034	1,09	67,4	0,016
878 C1	0,75	42,2	0,018	0,62	107,8	0,006
879 A7	2,51	546	0,005	1,44	263	0,006
879 C2	1,27	103	0,012	1,23	187	0,007
880 A11	0,72	86,9	0,008	0,51	117	0,004
880 B4	1,23	233	0,005	1,14	133	0,009
880 D11	1,38	130	0,011	1,50	232	0,006
881 A2	0,88	93,5	0,009	1,13	166,8	0,007
881 G3	0,69	99,2	0,007	0,69	61,8	0,011
881 G9	1,03	158	0,007	0,96	310	0,003
882 B12	0,87	30,3	0,029	0,49	78,9	0,006
882 C10	0,71	34,1	0,021	0,56	97,9	0,006
882 C7	1,62	45,3	0,036	0,96	75,6	0,013
882 F9	1,39	256	0,005	1,19	335	0,004
882 G6	0,95	47,4	0,020	0,74	98,7	0,007
882 G12	1,06	63,5	0,017	0,75	81,2	0,009
883 C4	1,26	46,8	0,027	0,67	83,9	0,008
883 G9	1,26	38	0,033	1,07	71,9	0,014

**EXEMPLO 17****RECOMBINAÇÃO MANUAL DE VARIANTES K9 KARI ATRAVÉS MUTAGÊNESE****DIRECIONADA A SÍTIO**

[0491] A Mutagênese direcionada a sítio dos derivados de K9G9 K9JB4 e K9JG3 (identificados no Exemplo 16 como 880 B4 e 881 G3 respectivamente) foi realizada para incorporar outras mudanças de aminoácido descritas nos exemplos. A etapa adicional foi a de adição à substituição de N87P que foi descrita no Exemplo 5. As mutações foram introduzidas nos genes KARI com Iniciadores N87PC1 (CTGACATCATTATGATCTTGATCCCAGATGAAAAGCAGGCTACCATGTAC; SEQ ID NO: 395) e N87PC1r (GTACATGGTAGCCTGCTTTTCATCTGGGATCAAGATCATAATGATGTCAG; SEQ ID NO: 396) que empregam o Kit de Mutagênese Direcionada a Sítio QuikChange® II (nº de catálogo 200523; Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, CA). Exceto pelos Iniciadores, modelos e ddH<sub>2</sub>O, todos os reagentes usados aqui foram supridos com o kit indicado acima. Os Iniciadores foram sintetizados comercialmente pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville IA). Os modelos foram variantes K9 KARI em vetores de *E. coli* (pBAD.KARI). Para mutagênese de K9JB4, a mistura de reação continha 1 µl de K9JB4 (50 ng/µl), 1 µl de cada iniciador (150 ng/µl), 5 µl de 10<sup>x</sup> de tampão de reação, 1 µl de mistura de dNTP, 1 µl de DNA polimerase Pfu Ultra HF e 40 µl de ddH<sub>2</sub>O. Para a mistura de reação K9JG3, 1 µl de K9JB4 (50 ng/µl) foi substituído por 1 µl de K9JG3 (50 ng/µl). As seguintes condições foram usadas para ambas as reações: A temperatura inicial foi 95 °C por 30 seg seguido por 16 ciclos de aquecimento/esfriamento. Cada ciclo consistiu de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e 68 °C por 5,0 min. Ao término da ciclagem de temperatura, as amostras foram mantidas no



aguardo de recuperação de amostra a 4 °C. 1 µl do Dpn I (10 U/µl) foi adicionado a cada reação e as misturas foram incubadas por 1 hora a 37 °C.

[0492] 2 µl de cada reação mutagênica foram transformados em TOP10 quimicamente competente de *E. coli* One Shot® (Invitrogen, nº de catálogo C404003) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram espalhados em placas de ágar que contêm o meio LB e 100 g/ml de ampicilina (nº de Catálogo L1004, Teknova Inc. Hollister, CA) e incubado a 37 °C durante a noite. Múltiplos transformantes foram, então, selecionados para sequenciamento de DNA com base em TempliPhi(TM) (GE Healthcare) pelo emprego de Iniciadores pBAD-For (ATGCCATAGCATTTTTATCC, SEQ ID NO: 393) e pBAD-Rev (CTGATTTAATCTGTATCAGGCT; SEQ ID NO: 394). Os transformantes com sequências KARI confirmadas foram inoculados em um meio LB que contém 100 µg/ml de ampicilina e incubados a 33 °C com agitação a 225 rpm. O DNA de plasmídeo foi isolado das células com o Kit de Minipreparo por Centrifugação QIAprep (nº de catálogo 2706; Qiagen, Valencia, CA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Os clones K9JB4P e K9JG3P resultantes foram derivados de K9JB4 e K9JG3, respectivamente. Mutagênese direcionada a sítio adicional foi realizada conforme descrito acima com modificações.

[0493] A variante K9JA1 foi derivada de K9JG3P pelo emprego de Iniciadores OK57E1 (GGTTTATTTCGAAGGTGCGGAGGAGTGGAAAAGAGCTG; SEQ ID NO: 397) e oK57E1r (CAGCTCTTTTCCACTCCTCCGCACCTTCGAATAAACC; SEQ ID NO: 398). A reação de mutagênese continha 1 µl de K9JG3P (50 ng/µl), 1 µl de cada iniciador (150 ng/ul), 5 µl de 10<sup>x</sup> tampão de reação, 1 µl de mistura de dNTP, 1 µl de DNA polimerase PfuUltra HF e 40 µl de ddH<sub>2</sub>O. As culturas

líquidas para transformantes de *E. coli* foram incubadas a 37 °C em vez de 33 °C.

[0494] A variante K9SB2 foi derivada de K9JB4P pelo emprego de Iniciadores oY53F1 (GTAACGTTATCATTGGTTTATACGAAGGTGCGGAGGAG; SEQ ID NO: 399) e oY53F1r (CTCCTCCGCACCTTCGAATAAACCAATGATAACGTTAC; SEQ ID NO: 400). A reação de mutagênese continha 1 µl de K9JB4P (50 ng/µl), 1 µl de cada iniciador (150 ng/ul), 5 µl de 10<sup>x</sup> tampão de reação, 1 µl de mistura de dNTP, 1 µl de DNA polimerase PfuUltra HF e 40 µl de ddH<sub>2</sub>O. As culturas líquidas para transformantes de *E. coli* foram incubadas a 37 °C em vez de 33 °C.

[0495] A variante K9SB2-K90L foi derivada de K9SB2 pelo emprego de Iniciadores oK90L1 (GATCTTGATCCCAGATGAATTGCAGGCTACCATGTACAAAAA C; SEQ ID NO: 401) e oK90L1r (GTT TTT GTA CAT GGT AGC CTG CAA TTC ATC TGG GAT CAA GAT C; SEQ ID NO: 402). A reação de mutagênese continha 2,5 µl de K9SB2 (50 ng/µl), 1 µl de cada iniciador (150 ng/ul), 5 µl de 10<sup>x</sup> tampão de reação, 1 µl de mistura de dNTP, 1 µl de DNA polimerase PfuUltra HF e 38,5 µl de ddH<sub>2</sub>O. Para os ciclos de aquecimento/esfriamento, a etapa de 55 °C por 30 seg foi aumentada para 1 min. As culturas líquidas para transformantes de *E. coli* foram incubadas a 37 °C em vez de 33 °C.

[0496] A variante K9SB2-K90M foi derivada de K9SB2 que emprega os iniciadores oK90M1 (CTTGATCCCAGATGAAATGCAGGCTACCATGTACAAAAAC; SEQ ID NO: 403) e oK90M1r (GTT TTT GTA CAT GGT AGC CTG CAT TTC ATC TGG GAT CAA G; SEQ ID NO: 404). A reação de mutagênese conteve 2.5 µl de K9SB2 (50 ng/µl), 1 µl de cada iniciador (150 ng/µl), 5 µl de tampão de reação de 10<sup>\*</sup>, 1 µl de mistura de dNTP, 1 µl de PfuUltra HF DNA polimerase, e 38,5 µl de

ddH<sub>2</sub>O. Para os ciclos de aquecimento/esfriamento, a etapa de 55 °C para 30 segundos foi aumentada para 1 minuto. As culturas de líquido para *E. coli* transformantes foram incubadas a 37 °C em vez de 33 °C.

**TABELA 22. SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDO DE VARIANTES K9G9 E COMBINAÇÕES**

Variante	SEQ ID No de Aminoácido	SEQ ID No de Ácido Nucleico	Substituições de Aminoácido
K9JB4	417	418	S56A, K57E, S58E
K9JB4P	419	420	S56A, K57E, S58E, N87P
K9JG3	421	422	Y53F, S56A, S58E, E74G
K9JG3P	423	424	Y53F, S56A, S58E, E74G, N87P
K9JA1	425	426	Y53F, S56A, K57E, S58E, E74<N87P
K9SB2	427	428	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
K9SB2-K90L	429	430	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K9C
K9SB2-K90M	431	432	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87K90M

### **EXEMPLO 18**

#### **CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DE DERIVADOS DE K9G9 PURIFICADOS COM RELAÇÕES**

##### **AUMENTADAS DE K<sub>m</sub> DE NADPH PARA K<sub>m</sub> DE NADH**

[0497] A K9G9 e as variantes foram expressas em excesso na cepa de *E. coli* Bw25113 ( $\Delta ilvC$ ), conforme descrito na Patente nº U.S. 8.129.162, e purificadas a fim de obter uma determinação mais precisa da velocidade máxima e da afinidade do cofator.

[0498] Para a expressão e a caracterização, plasmídeos de *E. coli* (pBAD.KARI) foram usados para transformar uma cepa eletrocompetente de *E. coli* Bw25113 ( $\Delta ilvC$ ) conforme descrito na Patente nº U.S. 8.129.162, com o uso de um BioRad Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Os clones transformados foram espalhados em placas de ágar que contêm o meio de LB e 100 µg/ml de ampicilina (nº101320-154, Teknova Inc. Hollister, CA) e incubados a 37 °C de um dia para o outro. Um único transformante para cada cepa foi marcado com listras em placas de LB com 100 µg/ml de ampicilina. Uma única colônia de cada uma dessas placas foi usada para inocular 10 ml de caldo de LB com 100 µg/ml de ampicilina. Essas culturas foram cultivadas por 8 horas a 37 °C com agitação em 125 ml de frascos com defletores com tampas filtradas e ventiladas. 200 µl dessa cultura foram usados

para inocular dois 500 ml frascos com defletores com tampas ventiladas filtradas que contêm caldo de LB com 100 µg/ml de ampicilina e 0,2% (p/v) de arabinose. As culturas de expressão foram cultivadas por 16 a 18 horas a 37 °C com agitação. As células foram colhidas in 40 ml de alíquotas através de centrifugação; o sobrenadante foi descartado e as péletes de célula foram congeladas a -80 °C até a purificação.

[0499]A K9G9 e todas as variantes foram purificadas com o uso do mesmo processo. Duas péletes de célula, em que cada uma representa 40 ml de alíquotas de cultura de célula, foram ressuspensas em 4 ml de Master Mix da Bug Buster (Novagen 71456, Darmstadt, Alemanha) e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente seguido por 15 minutos a 60 °C. Proteínas desnaturadas e detritos de célula foram peletizados através de centrifugação a 7.000 rpm por 30 minutos e 4 °C. O sobrenadante foi decantado, salvo e filtrado através de um filtro de seringa de 0,2 µm do tipo Acrodisc (PN4192, Pall, Ann Arbor, MI). A K9G9 foi purificada a partir do extrato filtrado livre de célula tratado termicamente que usa uma coluna de filtração em gel HiLoad 26/60 Superdex 200 da GE Healthcare (17-1071-01, Buckinghamshire, Inglaterra). A coluna foi pré-equilibrada com 0,2 CV de equilíbrio com HEPES 50 mM (pH 7,5), tampão de MgCl<sub>2</sub> 5 mM a uma taxa de fluxo de 2,0 ml/min antes do carregamento de proteína. A K9G9 e as variantes foram eluídas ao longo de uma etapa isocrática com 1,5 CV de HEPES 50 mM (pH 7,5), tampão de MgCl<sub>2</sub> 5 mM a uma taxa de fluxo de 2,0 ml/min. Frações de 2,5 ml em volume foram coletadas com o uso de um coletor de fração do tipo Frac-950 (Buckinghamshire, Inglaterra) em um padrão de serpentina. A K9G9 e as variantes foram todas eluídas entre frações D5 a E5 ou D6 a E4. As frações foram reunidas com o uso de um filtro spin Amicon Ultra YM-30 de 15 ml (UFC903008, Millipore, Billerica, MA) e lavadas com 10 ml de HEPES 100 mM (pH 6,8) e tampão de MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

O filtrado foi descartado e a proteína purificada foi eluída da membrana com o uso de 1 ml de tampão que contém HEPES 100 mM (pH 6,8) e  $\text{MgCl}_2$  10 mM.

[0500] Para determinar os valores  $V_{\max}$  e  $K_M$  para NADH e NADPH, as proteínas purificadas foram submetidas a ensaio em várias concentrações de NAD(P)H (0 a 1.000  $\mu\text{M}$ ) acopladas a um sistema de regeneração de NAD(P)H. Os ensaios foram conduzidos a 30 °C em um tampão que contém MOPS 100 mM, pH 6,8,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EDTA 1mM, (R/S)-acetolactato 5 mM, glicose-6-fosfato 1mM, 3 mU/ $\mu\text{l}$  de glicose-6-fosfato desidrogenase. A reação foi resfriada bruscamente após dez minutos com três volumes de ácido fórmico a 0,1%. A concentração de DHIV foi medida com o uso de LC-MS. A taxa de conversão de S-acetolactato para DHIV foi determinada medindo-se a quantidade de DHIV produzido em um ponto de tempo fixo. Os valores de  $V_{\max}$  e  $K_M$  valores foram calculados plotando-se a atividade específica (U/mg) *versus* a concentração de cofator e os dados foram ajustados à equação de Michaelis-Menten. As mensurações dos valores de  $K_m$  de acetolactato (em uma concentração fixa de NADH) indicaram que a concentração fixa de acetolactato empregada para as determinações de  $K_m$  de cofator estava saturando.

**TABELA 23. VALORES CINÉTICOS PARA VARIANTES K9G9 PURIFICADAS CONFORME DETERMINADO ATRAVÉS DE ENSAIOS DE FORMAÇÃO DE DHIV**

Variante	$V_{\max}$ de NADPH, U/mg	$K_m$ de NADPH, $\mu\text{M}$	$V_{\max}/K_m$ de NADH, l/min*mg	$V_{\max}$ de NADH, U/mg	$K_m$ de NADH, $\mu\text{M}$	$V_{\max}/K_m$ de NADH, l/min*mg
K9G9	2,2	24,1	0,091	1,9	78,2	0,024
K9JB4	2,7	249	0,011	3,4	115	0,030
K9JB4P	2	83,2	0,024	2,9	34,1	0,085
K9G3	3,1	113	0,027	2,8	106	0,026
K9G3P	1,8	33,6	0,054	2,1	18,1	0,116
K9JA1	2,6	63,4	0,041	3,4	14	0,243
K9SB2-K90L	2,1	173	0,012	2,4	28,6	0,084
K9SB2-K90M	1,8	245	0,007	2,2	41,3	0,053

**EXEMPLO 19****PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL DE DERIVADOS DE K9G9 COM RELAÇÕES AUMENTADAS DE  $K_M$  DE NADPH PARA  $K_M$  DE NADH**

[0501] Os plasmídeos de expressão de levedura para K9JB4, K9JB4P, K9JG3, K9JG3P, K9JA1 e K9SB2 foram criados subclonando-se os genes de KARI de variante dos vetores de *E.coli* (pBAD.KARI) em pHR81-PIIv5-KARI-K9.G9 no sítios PmeI e SfiI. Os plasmídeos resultantes juntamente com pHR81-PIIv5-KARI-K9.G9 e pHR81-PIIv5-KARI-K9.D3 (SEQ ID NO: 181) foram analisados para produção de isobutanol e formação de subproduto na levedura. As cepas de via de levedura foram criadas no hospedeiro de PNY2259 (MATa ura3 $\Delta$ ::loxP his3 $\Delta$  pdc6 $\Delta$  pdc1 $\Delta$ ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t-P[FBA1]-ALS|alsS\_Bs- CYC1t pdc5 $\Delta$ ::P[PDC5]-ADH|sadB\_Ax-PDC5t gpd2 $\Delta$ ::loxP fra2 $\Delta$ ::P[PDC1]-ADH|adh\_HI-ADH1t adh1 $\Delta$ ::UAS(PGK1 )P[FBA1]-kivD\_Lg(y)-ADH1t yprcA15 $\Delta$ ::P[PDC5]-ADH|adh\_HI-ADH1t ymr226c $\Delta$  ald6A::loxP; Exemplo 22) cotransformando-se os vetores de KARI como o plasmídeo de via nº1, e pBP915 (pRS423-P<sub>FBA1</sub>-DHAD-P<sub>GPM1</sub>-hADH1; SEQ ID NO: 182) como o plasmídeo de via nº 2. As células transformadas foram colocadas em placas em um meio sintético sem histidina ou uracila (1% de etanol como fonte de carbono). Três transformantes foram transferidos para placas novas dos mesmos meios. Os transformantes foram testados para produção de isobutanol sob condições anaeróbicas em recipientes de soro.

[0502] Colônias de levedura a partir da transformação nas placas de SE-Ura-His apareceram após 3 a 5 dias. As colônias livres a partir de cada variante foram remendadas em placas novas de SE-Ura-His, incubadas a 30 °C por 3 dias.

#### Procedimento e meios de cultivo

[0503] Dois tipos de meios foram usados durante o procedimento de cultivo de cepas de levedura: um meio de pré-cultura aeróbica e um meio de

cultura anaeróbica. Todas as substâncias químicas foram obtidas a partir de Sigma, salvo indicação ao contrário (St. Louis, MO).

[0504] Meio de pré-cultura aeróbica (SE-Ura-His): 6,7 g/l de base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos (Difco, 291940, Sparks, MD), 1,4 g/l de suplemento de meio de retirada sintético de levedura sem histidina, leucina, triptofano e uracila, 0,2% de etanol, 0,2% de glicose, 0,01% em p/v de leucina e 0,002% em p/v de triptofano.

[0505] Meio de cultura anaeróbica (SEG-Ura-His): MES 50 mM (pH 5,5), 6,7 g/l de base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos (Difco, 291940, Sparks, MD), 1,4 g/l de suplemento de meio de retirada sintético de levedura sem histidina, leucina, triptofano e uracila, 0,1% de etanol, 3% de glicose, 0,01% de leucina, 0,002% de triptofano, 30 mg/l de ácido nicotínico, 30 mg/l de tiamina e 10 mg/l de ergosterol criado em uma solução de Tween/etanol de 50/50 em v/v.

[0506] As células remendadas foram inoculadas em 25 ml de meio SEG-Ura,His com 0,2% de glicose e 0,2% de etanol, e cultivadas sob condições progressivamente limitadas de oxigênio com a tampo fechada por aproximadamente 48 horas a 30 °C com agitação, até que um valor de OD<sub>600</sub> alvo de aproximadamente 1,5 a 2 foi alcançado. Valores de OD<sub>600</sub> foram gravados. As células foram peletizadas através de centrifugação e o sobrenadante foi descartado. As péletes de célula foram transferidas para o interior de um Bolsa Anaeróbica da Coy (Grass Lake, MI) em que as péletes foram ressuspensas em 1,0 ml de meio de cultivo anaeróbico (SEG-Ura-His). As péletes de célula ressuspensas foram usadas para inocular 30 ml de meio SEG-Ura-His em 50 ml de garrafas de soro (Wheaton, 223748, Millville, NJ) para um valor alvo de OD<sub>600</sub> inicial de 0,2. Permitiu-se que todos os meios anaeróbicos, recipientes de soro, rolhas e enrugamentos fossem desgaseificados na bolsa anaeróbica por pelo menos 24 horas antes da

inoculação. As bolsas de soro foram vedadas, enrugadas e transferidas para fora da bolsa anaeróbica e cultivadas a 30 °C com agitação a 240 rpm. As culturas anaeróbicas foram cultivadas por 24 a 72 horas com um valor de OD<sub>600</sub> alvo de pelo menos 1,2. As etapas de cultivo anaeróbico adicionais usaram as células da etapa de cultura anaeróbica anterior como inoculante. Três transformantes foram avaliada para cada variante.

[0507] Análise de HPLC de cepas de levedura com variantes de KARI K9G9

[0508] Foram tiradas amostras para análise de HPLC e para obter os valores de OD<sub>600</sub> no fim do período de cultivo anaeróbico. A análise de HPLC foi realizada com o uso de uma unidade de separações 2695, um detector de matriz de fotodiodo 2996 e um detector de índice refrativo 2414 da Waters (Waters, Milford, MA) com uma pré-coluna Sugar SH-G da Shodex e uma coluna de separações Sugar SH1011 da Shodex (Shodex, JM Science, Grand Island, NY). Os compostos foram separados através de eluição isocrática em 0,01 N de ácido sulfúrico com uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. Os cromatogramas foram analisados com o uso do software Empower Pro da Waters.

[0509] Os rendimentos molares para glicerol, isobutanol e a relação de glicerol/isobutanol foram determinados. As médias e os desvios padrões foram calculados a partir de análises triplicadas para cada variante. O teste t de Student foi então empregado para determinar se a diferença nos valores foi estatisticamente significativa a partir dos valores de controle de K9D3. Para as novas variantes, espera-se que os aumentos nos valores K<sub>M</sub> para NADPH em relação ao K<sub>M</sub> para NADH resultem na utilização reduzida de NADPH. Os resultados informados na Tabela abaixo e na Figura 9 indicam que as novas variantes com relações aumentadas do K<sub>M</sub> de NADPH para o K<sub>M</sub> de NADH exibem relações de glicerol para isobutanol mais altas em relação à K9D3 e à K9G9. A K9SB2 demonstrou um aumento de 35% na titulação de isobutanol em comparação com a K9D3.



**TABELA 24. DADOS DE ISOBUTANOL E CINÉTICOS DE VARIANTES K9G9**

	Variante	$K_m$ (NADPH)/ $K_m$ (NADH)	Relação de Isobutanol/Glicerol	Rendimento Molar de Isobutanol	Titulação de Isobutanol, nM
Experimento 1	K9D3	0,24	1,67 +- 0,02	0,581 +- 0,007	33,9 +- 1,8
	K9JB4	2,2	2,10 +- 0,06	0,603 +- 0,006	35,3 +- 1,31
	K9JG3	1,1	2,07 +- 0,06	0,598 +- 0,004	39,1 +- 1,6
Experimento 2	K9D3	0,24	1,75 +- 0,06	0,586 +- ,0100	63,7 +- 0,6
	K9JA1	4,5	2,24 +- 0,04	0,611 +- 0,002	78,2 +- 5,4
	K9SB2	3,9	2,21 +- 0,10	0,608 +- 0,007	77,2 +- 1,4
Experimento 3	K9G9	0,31	2,10 +- 0,03	0,624 +- 0,011	54,2 +- 1,5
	K9JG3P	1,9	2,56 +- 0,08	0,652 +- 0,009	66,3+4,0
	K9JB4P	2,4	2,54 +- 0,07	0,654 +- 0,006	61,5 +- 3,4

**EXEMPLO 20****CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE PCR PROPENSO A ERRO DE K9SB2**

[0510] A biblioteca de PCR propenso a erro de K9SB2 foi construída de uma maneira semelhante à biblioteca de K9G9 com as seguintes modificações. A mistura de PCR mutagênica consistiu em 9,5 µl de K9SB2 em um vetor de pBAD.KARI (190 ng/ µl), 1,25 µl de iniciador K9G9\_EZ\_F1 (100 ng/ µl), 1,25 µl de iniciador K9G9\_EZ\_R1 (100 ng/ µl), 5 µl de tampão de reação de 10\* Mutazyme II, 1 µl de mistura de dNTP 40 mM, 1,5 µl de DNA polimerase Mutazyme II, e 30,5 µl de ddH<sub>2</sub>O. A "reação em EZclone " conteve 25 µl da mistura de enzima 2\* EZClone, 3 µl de megainiciador (produto de PCR mutagênica de K9SB2, 190 ng/µl), 2,6 µl de DNA de modelo de K9SB2 (19 ng/µl), 3 µl de solução 1 de EZClone, e 16 µl de ddH<sub>2</sub>O. Para a etapa de Dpn I, a mistura foi incubada por 3 horas a 37 °C. Os clones foram empregados para triagem de alta produtividade conforme descrito no Exemplo 21.

**EXEMPLO 21.**

**TRIAGEM PARA VARIANTES K9SB2 COM RELAÇÕES AUMENTADAS ADICIONAIS DE**  
**KM DE NADPH PARA KM DE NADPH COM BASE NAS RELAÇÕES DE ATIVIDADE**

**AUMENTADAS DE NADH PARA NADPH**

[0511] A biblioteca de K9SB2 descrita no Exemplo 20 sofreu triagem para variantes com afinidade de NADPH reduzida. Com o objetivo específico de aumentar o  $K_m$  para NADPH em relação ao  $K_m$  para NADH, os

acertos a partir da triagem foram parcialmente purificados e análises cinéticas foram realizadas para determinar parâmetros de  $V_{\max}$  e  $K_m$  com NADH e com NADPH.

Ensaio de triagem de alta produtividade de biblioteca de gene de K9SB2

[0512] As variantes passaram por triagem com o uso de HTS conforme descrito no Exemplo 16, com as seguintes exceções. O tampão do ensaio consiste em (R/S)-acetolactato 2,4 mM, HEPES 100 mM de pH 6,8,  $MgCl_2$  10 mM, 150  $\mu M$  de NADH ou 100  $\mu M$  de NADPH e 12,5  $\mu l$  de 0,5 X de lisato de célula.

[0513] A relação para a taxa medida para a oxidação de 100  $\mu M$  de NADPH para a taxa medida para a oxidação de 150  $\mu M$  de NADH foi calculada para cada variante e poço de controle positivo (2 por placa). Considerou-se que um poço de variante contém um acerto inicial se a taxa de NADH for maior que 0,6 OD/hora e a relação de taxa (NADPH/NADH) for menor que 0,37 (três desvios padrões inferior à média de controle positivo). Um total de 218 acertos foi identificado a partir de uma reunião de 4947 variantes potenciais. Esses acertos iniciais foram consolidados, formando uma biblioteca menor para análise adicional.

[0514] A biblioteca de acerto inicial consolidada foi cultivada em triplicado biológico e extratos livres de célula foram preparados e submetidos a ensaio conforme descrito acima. As relações de taxa foram então calculadas para as variantes e os controles positivos conforme descrito acima. Os acertos finais que foram selecionados para análise cinética detalhada cumpriram os seguintes critérios: a relação de taxa de NADPH/NADH foi menor que 0,45, a taxa de NADH foi maior que 0,6 OD/hora e pelo menos dois dentre três replicados biológicos passaram pelos critérios. 107 variantes foram identificadas.

[0515] Os dados foram analisados, ainda, para identificar as variantes que tiveram uma taxa de conversão maior para S-acetolactato para DHIV com o cofator de NADH. A taxa média e o desvio padrão de oxidação de NADH foram calculados para todos os controles positivos. Uma variante foi considerada como acerto potencial se a taxa de oxidação de NADH foi pelo menos 3 desvios padrões superior à taxa do controle positivo (2,524 OD/hora). 68 variantes foram identificadas e a análise de sequência determinou que 17 tinham pelo menos uma substituição de aminoácido. Cada uma das substituições T93A e T93I apareceu duas vezes e as variantes 2017 B12 e D6 foram selecionadas para análise adicional.

[0516] O sequenciamento de DNA das 107 variantes identificadas a partir da triagem de HTS secundária foi concretizada usando-se TempliPhi™ (GE Healthcare) com os iniciadores pBAD-For (ATGCCATAGCATTTTTATCC; SEQ ID NO: 393) e pBAD-Rev (CTGATTTAATCTGTATCAGGCT; SEQ ID NO: 394). 105 sequências foram diferentes do pai e as substituições de aminoácido são listadas na primeira das duas tabelas seguintes.

[0517] O sequenciamento de DNA das 68 variantes identificadas a partir da triagem de taxa de NADH foi concretizada usando-se TempliPhi™ (GE Healthcare) com os iniciadores pBAD-For (ATGCCATAGCATTTTTATCC; SEQ ID NO: 393) e pBAD-Rev (CTGATTTAATCTGTATCAGGCT; SEQ ID NO: 394). 17 sequências foram do tipo selvagem de forma diferente e as substituições de aminoácido das 2 substituições que apareceram repetidamente são listadas na segunda tabela abaixo.

**TABELA 25. SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDO DE VARIANTES K9SB2**

Variante	Seq	Substituições de Aminoácido
K9SB2	427	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2011 A2	433	Y53F, G55D, S56A, K57E, S58E, N87P
2011 A3	434	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I
2011 A5	435	Y53F, S56A, K57E, S58E, M83I, N87P, L185M, E217D

Variante	Seq	Substituições de Aminoácido
2011 A7	436	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, D98V
2011 A9	437	Y53F, S56A, K57E, S58E, F67I, N87P
2011 A11	438	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94T, K126E, T273A
2011 B1	439	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, A279T
2011 B2	440	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, Q91L
2011 B3	441	Y53L, S56A, K57E, S58E, N87P
2011 B4	442	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135T
2011 B7	443	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, L185M
2011 B8	444	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, C233S, F296Y
2011 B10	445	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, A303D
2011 C1	446	Y53F, S56A, K57E, S58E, E63K, N87P, G251D, K294R
2011 C3	448	Y53F, S56A, K57E, S58E, A72V, N87P, N102Y, F189I, Y245H
2011 C6	449	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84F, N87P
2011 C7	450	E13V, Y53F, S56A, K57E, S58E, M94I, N87P, T141I
2011 C8	451	Y53F, S56A, K57E, S58E, A72V, N87P, N102Y, F189I, Y245H
2011 C9	447	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, E194D
2011 C10	452	Y53F, A56G, K57E, S58E, K60N, N87P
2011 C12	453	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84L, N87P, N97T
2011 D1	454	L39M, Y53F, S56A, K57E, S58E, E68G, N87P
2011 D2	455	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, V307I
2011 D3	456	Y53F, S56A, K57E, S58E, F67I, N87P
2011 D4	457	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135L, A202V
2011 D5	458	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, G164S, G199A
2011 D6	500	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, S247C
2011 D8	459	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, N116I
2011 D9	460	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M
2011 D11	461	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94L, T259I
2011 D12	462	Y53F, S56A, K57E, S58E, M83K, N87P
2011 E3	463	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, I122V, L297W
2011 E4	464	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, A112S, Q160R
2011 E8	465	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, V142I, P320L
2011 E11	466	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, Q91L
2011 F2	467	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P, A210T
2011 F4	468	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, F189I
2011 F6	469	Y53F, S56G, K57E, S58E, K60N, N87P
2011 F9	470	A41V, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, S305P
2011 F10	471	Y53F, S56A, K57E, S58E, L85M, N87P
2011 G1	472	E13V, Y53F, S56A, K57E, S58E, M94I, N87P, T141I
2011 G3	473	H35Q, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2011 G4	474	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84F, N87P
2011 G8	475	A26T, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M
2011 G9	476	Y53F, S56T, K57E, S58E, N87P
2011 G10	477	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84F, N87P
2011 H1	478	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, V156L
2011 H5	479	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84L, N87P
2011 H7	480	Y53F, S56T, K57E, S58E, N87P
2011 H9	481	Y53F, G55C, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 A2	482	Y53F, S56A, K57E, S58E, R61G, I86V, N87P
2012 A7	483	Y53F, S56A, K57E, S58E, T71S, A76V, N87P
2012 A8	484	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M212T
2012 A9	485	H35Q, Y53F, S56A, K57E, S58E, A72T, N87P
2012 A10	486	A36T, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P

Variante	Seq	Substituições de Aminoácido
2012 A11	487	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, S247T
2012 B3	488	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135S
2012 B4	489	Y53F, S56A, K57E, S58E, W59R, N87P, K278E
2012 B5	490	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P, I234V
2012 B6	491	Y30H, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 B9	492	I50M, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 C2	493	Y53L, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 C3	494	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, F115V, T191S, V208I, C209W, F292I
2012 C5	495	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I
2012 C6	496	Y53F, S56A, K57E, S58E, F67L, N87P
2012 C8	497	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, M169T
2012 C10	498	Y53F, S56A, K57E, S58E, F67I, N87P, T276I
2012 D1	499	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84F, N87P, M132T
2012 D8	501	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135S
2012 D11	502	K8N, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M, T141I
2012 E5	503	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84L, N87P
2012 E9	504	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, V142I, T191S, C233S
2012 F1	505	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, H235Y
2012 F2	506	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P, V232D
2012 F3	507	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M, V142I, T187S
2012 F4	508	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, G149D
2012 F7	509	E13V, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, T141I
2012 F10	510	Y53F, S56A, K57E, S58E, Q65H, N87P, F189I
2012 F12	511	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P
2012 G3	512	Y53F, S56T, K57E, S58E, N87P, R190S
2012 G4	513	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, N102S, V142I
2012 G5	514	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84L, N87P
2012 G8	515	Y53F, S56A, K57E, S58E, K77N, N87P, A92V
2012 G9	516	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, V307I
2012 G10	517	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, T195I
2012 G12	518	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, F309I
2012 H1	519	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90T, A180S
2012 H3	520	Y53F, S56A, K57E, S58E, W59C, N87P
2012 H7	521	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, A202T
2012 H9	522	H35N, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 H11	523	Y53F, S56A, K57E, S58E, A72V, N87P, L211M, I240M
2013 A2	524	Y53F, S56T, K57E, S58E, N87P, Q288H
2013 A4	525	Y53F, S56A, K57E, S58E, L85M, N87P
2013 A5	526	L52S, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2013 B2	527	A36T, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, V203I
2013 B5	528	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135T
2013 B7	529	I9M, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90E
2013 B8	530	Y53F, G55C, S56A, K57E, S58E, N87P
2013 B9	531	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P
2013 B11	532	A38V, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2013 C1	533	Y53L, S56A, K57E, S58E, N87P, M237I
2013 C6	534	K23M, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, E194D
2013 C8	535	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135T
2013 C12	536	Y53F, S56A, K57E, S58E, A72V, N87P, T93S, A176V, H235Y
2013 D1	537	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94R, K310M

**TABELA 26. SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDO DE VARIANTES K9SB2**

Variante	Seq ID NO de AA; Seq ID NO de Ácido nucleico	Substituições de Aminoácido
K9SB2	427	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2017 B12	639; 640	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, T93I
2017 D6	641; 642	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, T93A

Análise cinética de proteínas de variantes K9SB2 parcialmente purificadas

[0518] A cepa de *E. coli* Bw25113 ( $\Delta ilvC$ ), conforme descrito na Patente nº U.S. 8.129.162, foi usada para expressar as 107 variantes a partir da triagem de HTS secundária e da K9SB2 de controle positivo. Os clones a partir das placas de arquivo foram inoculados no interior das placas de 96 poços profundos. Cada poço conteve 3,0 µl de células a partir de placas de arquivos descongeladas, 200 µl do meio de LB que contém 100 µg/ml de ampicilina e 0,02% (p/v) de arabinose como o indutor. As células foram cultivadas de um dia para o outro a 37 °C com 80% de umidade durante a agitação (900 rpm), colhida através de centrifugação (4.000 rpm, 7 minutos a 4 °C) (75004251, Thermo Scientific, Rockford, IL) e a pélete de célula foi armazenada a -80 °C para análise posterior.

[0519] As péletes de célula congeladas em placas de poços profundos foram descongeladas em temperatura ambiente por 30 minutos ao mesmo tempo. 75 µl de BugBuster a 50% (Novagen 71456, Darmstadt, Germany) (v/v em água) foram adicionados a cada uma e as células foram suspensas com o uso de um agitador de placa. A suspensão de células em Bug Buster a 50% foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, o que foi então seguido por uma incubação de 15 minutos a 60 °C. Os detritos de célula e as proteínas termicamente instáveis desnaturadas foram peletizadas através de centrifugação (4.000 rpm, 15 minutos a 4 °C) (75004251, Thermo Scientific, Rockford, IL) e 75 µl do sobrenadante foram transferidos para uma

placa de 96 poços de fundo plano (Corning, 3370, Corning, NY) e diluídos duas vezes com 75 µl de HEPES 100 mM (pH 6,8), KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

[0520] A proteína total foi determinada usando-se o Ensaio de Bradford com Coomassie Plus (Thermo Scientific, nº23238, Rockford, IL). O BSA foi empregado conforme o padrão. A concentração de proteína foi medida determinando-se a absorvância a 595 nm com o uso de um espectrofotômetro Cary 300 (Agilent Technologies, Wilmington, DE).

[0521] Para determinar os valores  $V_{\max}$  e os valores  $K_M$  para NADH e NADPH, as proteínas parcialmente purificadas foram submetidas a ensaio em várias concentrações de NADH (20, 30, 40, 60, 80, 120, 200 e 300 µM) e NADPH (60, 80, 120, 200, 300 e 400 µM). Os ensaios foram conduzidos a 30 °C em HEPES 100 mM (pH 6,8), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 100 mM e *R/S*-acetolactato 4,8 mM. Entre 0,005 a 0,015 mg/ml de proteína total foi adicionado ao ensaio. A taxa de conversão de *S*-acetolactato para DHIV foi medida através do monitorando da oxidação de NAD(P)H a 340 nm com o uso de um leitor de placa Spectramax 384 Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A atividade foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar de 6220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Os valores  $V_{\max}$  e  $K_m$  foram calculados plotando-se a atividade específica (U/mg) *versus* a concentração de cofator e os dados foram ajustados à equação de Michaelis-Menten com o uso do software Kaleidagraph (Synergy, Reading, PA).

**TABELA 27. VALORES CINÉTICOS PARA VARIANTES K9SB2 PARCIALMENTE PURIFICADAS**  
**CONFORME DETERMINADO ATRAVÉS DE ENSAIOS DE CONSUMO DE NAD(P)H**

Variante	$V_{\max}$ de NADPH, U/mg	$K_m$ de NADPH, µM	$V_{\max}/K_m$ de NADH, l/min*mg	$V_{\max}$ de NADH, U/mg	$K_m$ de NADH, µM	$V_{\max}/K_m$ de NADH, l/min*mg
K9SB2	1,79	153	0,012	2,10	87,4	0,024
2011 A2	1,48	897	0,002	1,94	71,2	0,027
2011 A3	1,43	371	0,004	1,33	44,1	0,030
2011 A5	0,93	109	0,009	0,23	17,4	0,017
2011 A7	2,27	334	0,007	1,70	69,2	0,025
2011 A9	2,09	266	0,008	0,40	n/d	n/a
2011 A11	2,21	294	0,008	1,25	25,8	0,048

Variante	V <sub>max</sub> de NADPH, U/mg	K <sub>m</sub> de NADPH, μM	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> de NADH, l/min*mg	V <sub>max</sub> de NADH, U/mg	K <sub>m</sub> de NADH, μM	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> de NADH, l/min*mg
2011 B1	1,79	421	0,004	64,5	55171	0,001
2011 B2	0,33	254	0,001	0,02	264	0,007
2011 B3	1,87	505	0,004	0,68	225	0,003
2011 B4	0,36	294	0,001	0,26	171	0,002
2011 B7	n/d	1,03	n/a	0,48	25,5	0,019
2011 B8	0,83	109,5	0,008	0,61	28,7	0,021
2011 B10	0,88	171	0,005	0,46	7,53	0,061
2011 C1	1,06	404	0,003	1,51	191	0,008
2011 C3	1,08	844	0,001	2,53	500	0,005
2011 C6	1,19	388	0,003	1,90	189	0,010
2011 C7	0,71	946	0,001	1,95	457	0,004
2011 C8	1,73	1546	0,001	3,73	750	0,005
2011 C9	1,02	123	0,008	2,29	177	0,013
2011 C10	1,02	656	0,002	3,84	899	0,004
2011 C12	2,74	244	0,01	13,08	99	0,031
2011 D1	4,68	501	0,009	3,54	80,4	0,044
2011 D2	2,34	547	0,004	2,18	77,3	0,028
2011 D3	0,05	306	0,0002	0,05	44,3	0,001
2011 D4	0,47	857	0,001	0,44	91,6	0,005
2011 D5	0,75	550	0,001	0,42	57,1	0,007
2011 D6	0,70	200	0,004	0,52	25,11	0,021
2011 D8	0,04	214	0,0002	0,04	38,9	0,001
2011 D9	0,18	407	0,0004	0,16	50,2	0,003
2011 D11	0,78	185	0,004	0,61	15,0	0,041
2011 D12	0,74	190	0,004	0,80	39,0	0,021
2011 E3	0,77	163	0,005	1,54	128	0,012
2011 E4	1,59	270	0,006	3,78	234	0,016
2011 E8	0,91	435	0,002	2,16	252	0,009
2011 E11	5,56	6466	0,001	3,06	511	0,006
2011 F2	0,39	692	0,001	1,79	136	0,013
2011 F4	2,07	242	0,009	2,00	68,3	0,029
2011 F6	1,19	946	0,001	1,35	231	0,006
2011 F9	0,57	269	0,002	0,45	27,1	0,017
2011 F10	1,43	390	0,004	1,55	79,8	0,019
2011 G1	1,31	1533	0,001	0,50	40,1	0,013
2011 G3	0,61	1003	0,001	1,00	283	0,004
2011 G4	1,00	316	0,003	2,13	174	0,012
2011 G8	0,90	482	0,002	1,22	106	0,012
2011 G9	0,30	530	0,001	3,48	549	0,006
2011 G10	0,93	358	0,003	2,13	238	0,009
2011 H1	0,96	218	0,004	1,57	114	0,014
2011 H5	1,17	81,2	0,014	1,85	86,5	0,022
2011 H7	0,20	435	0,001	1,25	173	0,007
2011 H9	1,30	741	0,002	1,55	177	0,009
2012 A2	1,71	264	0,007	1,58	55,4	0,029
2012 A7	1,98	215	0,009	1,87	67,3	0,028
2012 A8	1,19	91,8	0,013	1,24	22,7	0,055
2012 A9	0,44	481	0,001	0,34	38,1	0,009
2012 A10	1,21	340	0,004	1,31	66,7	0,020
2012 A11	1,99	342	0,006	1,37	35,9	0,038
2012 B3	0,88	1214	0,001	0,42	63,8	0,007
2012 B4	4,34	1593	0,003	1,66	95,1	0,018
2012 B5	4,88	7389	0,001	1,19	85,2	0,014



Variante	V <sub>max</sub> de NADPH, U/mg	K <sub>m</sub> de NADPH, μM	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> de NADH, l/min*mg	V <sub>max</sub> de NADH, U/mg	K <sub>m</sub> de NADH, μM	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> de NADH, l/min*mg
2012 B6	3,72	428	0,009	2,23	51,3	0,044
2012 B9	1,17	523	0,002	0,87	63,7	0,014
2012 C2	4,43	923	0,005	3,16	189	0,017
2012 C3	1,40	203	0,007	1,80	68,9	0,026
2012 C5	1,73	348	0,005	3,66	268	0,014
2012 C6	2,18	234	0,009	2,90	103	0,028
2012 C8	1,53	394	0,004	2,63	194	0,014
2012 C10	1,12	286	0,004	1,41	78,9	0,018
2012 D1	0,72	599	0,001	0,58	64,5	0,009
2012 D8	1,17	1528	0,001	0,47	73,6	0,006
2012 D11	0,43	334	0,001	0,52	27,7	0,019
2012 E5	2,13	257	0,008	4,77	313	0,015
2012 E9	1,07	1326	0,001	n/d	n/d	n/a
2012 F1	1,70	272	0,006	1,48	62,5	0,024
2012 F2	0,39	925	0,0004	0,79	97,8	0,008
2012 F3	1,40	2213	0,0006	0,94	142	0,007
2012 F4	2,70	719	0,004	1,50	72,9	0,021
2012 F7	0,86	840	0,001	0,77	117	0,007
2012 F10	1,92	170	0,011	1,75	27,4	0,064
2012 F12	0,90	1582	0,0006	1,75	117	0,015
2012 G3	1,47	1003	0,002	1,07	127	0,008
2012 G4	0,73	615	0,001	0,63	81,6	0,007
2012 G5	1,92	240	0,008	2,00	83,5	0,024
2012 G8	1,17	315	0,004	0,99	58,7	0,017
2012 G9	2,41	717	0,003	1,37	91,5	0,015
2012 G10	1,06	400	0,003	0,71	39,8	0,018
2012 G12	1,58	147	0,01	12,00	70,0	0,029
2012 H1	1,49	195	0,008	1,74	68,9	0,025
2012 H3	14,98	7389	0,002	1,45	99,0	0,015
2012 H7	1,14	246	0,005	1,30	76,2	0,017
2012 H9	0,37	210	0,002	n/d	n/d	n/a
2012 H1	10,65	162	0,004	0,62	32,0	0,019
2013 A2	0,58	285	0,002	0,64	71,0	0,009
2013 A4	0,63	188	0,003	0,86	81,5	0,011
2013 A5	0,61	886	0,001	0,88	210	0,004
2013 B2	0,62	282	0,002	0,71	70,4	0,010
2013 B5	6,68	7389	0,001	0,083	150	0,006
2013 B7	1,22	433	0,003	1,12	79,0	0,014
2013 B8	0,42	90,7	0,005	1,27	191	0,007
2013 B9	5,31	13970	0,0004	1,38	217	0,006
2013 B1	10,48	212	0,002	0,60	63,2	0,010
2013 C1	0,49	149	0,003	0,68	64,8	0,0105
2013 C6	0,54	163	0,003	0,36	24,4	0,015
2013 C8	2,87	3752	0,001	0,70	188	0,004
2013 C12	0,75	495	0,002	0,79	115	0,007
2013 D1	1,31	1608	0,001	0,87	188	0,005

**EXEMPLO 22****CONSTRUÇÃO DA CEPA PNY2259**

[0522] A finalidade desse exemplo é descrever o conjunto dos construtos usados para substituir a cópia cromossômica de *kivD\_LI(y)* em PNY2238 no local *adh1Δ* com *kivD\_Lg(y)*.

[0523] A deleção/integração foi criada através de recombinação homóloga com produtos de PCR que contém regiões de homologia a montante e a jusante da região alvo e do gene *URA3* para a seleção de transformantes. O gene *URA3* foi removido através de recombinação homóloga para criar uma deleção/integração sem marcas. O plasmídeo para integrar *kivD\_Lg(y)* foi derivado de um plasmídeo construído para integrar *UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_LI(y)* no local *ADH1* de *Saccharomyces cerevisiae*. A construção do plasmídeo usado para integrar *UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_LI(y)* no local *ADH1* é descrita abaixo. Os plasmídeos foram construídos em pUC19-*URA3MCS*.

**CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO DE INTEGRAÇÃO DE UAS(PGK1 )PFFBA11-KIVD LKV)/DELEÇÃO DE ADH1**

[0524] A região de codificação de *kivD* do códon de *Lactococcus lactis* otimizada para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, *kivD\_LI(y)*, foi amplificada com o uso de pLH468 (SEQ ID NO: 139) como modelo com o iniciador oBP562 (SEQ ID NO: 197), que contém um sítio de restrição de *PmeI*, e o iniciador oBP563 (SEQ ID NO: 198), que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 5' do Fragmento B de *ADH1*. O fragmento B de *ADH1* foi amplificado a partir do DNA genômico de CEN.PK 113-7D a partir de *Saccharomyces cerevisiae* com o iniciador oBP564 (SEQ ID NO: 199), que contém uma extremidade 5' com homologia à terminação 3' de *kivD\_LI(y)*, e o iniciador oBP565 (SEQ ID NO: 200), que contém um sítio de restrição de *FseI*. Os produtos de PCR foram purificados com um kit de Purificação de PCR (Qiagen; Valencia, CA). O Fragmento B de *kivD\_LI(y)-ADH1* foi criado

sobrepondo-se a PCR através da mistura do produtos de PCR do Fragmento B de ADH1 e kivDJJ(y) e amplificando-se com os iniciadores oBP562 (SEQ ID NO: 197) e oBP565 (SEQ ID NO: 200). O produto de PCR resultante foi digerido com PmeI e FseI e ligado à DNA ligase de T4 no sítios correspondentes de pUC19-URA3MCS após a digestão com as enzimas apropriadas. O Fragmento A de ADH1 foi amplificado a partir de DNA genômico com o iniciador oBP505 (SEQ ID NO: 201), que contém um sítio de restrição de SacI, e o iniciador oBP506 (SEQ ID NO: 202), que contém um Sítio de restrição de AseI. O produto de PCR do Fragmento A de ADH1 foi digerido com SacI e AseI e ligado à DNA ligase de T4 nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém o Fragmento B de kivD\_LI(y)-ADH1. ADH1 O Fragmento C foi amplificado partir do DNA genômico com o iniciador oBP507 (SEQ ID NO: 203), que contém um sítio de restrição de PaeI, e o iniciador oBP508 (SEQ ID NO: 204), que contém um sítio de restrição de SalI. O produto de PCR do Fragmento C de ADH1 foi digerido com PaeI e SalI e ligado à DNA ligase de T4 nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém o Fragmento A de ADH1 /Fragmento B de kivD\_LI(y)-ADH1. O promotor híbrido UAS(PGK1)-P<sub>FBA1</sub> (SEQ ID NO: 406) foi amplificado a partir do vetor pRS316-UAS(PGK1)-P<sub>FBA1</sub>-GUS com o iniciador oBP674 (SEQ ID NO: 205), que contém um sítio de restrição de AseI, e o iniciador OBP675 (SEQ ID NO: 206), que contém um sítio de restrição de PmeI. O produto de PCR de UAS(PGK1)-P<sub>FBA1</sub> foi digerido com AseI e PmeI e ligado à DNA ligase de T4 nos sítios correspondentes do plasmídeo que contém Fragmentos ABC de kivD\_LI(y)-ADH1 para gerar o pBP1181.

#### **CONSTRUÇÃO DE PBP1716 E PBP1719**

[0525] A kivDJJ(y) foi removida do pBP1181 de plasmídeo de integração de UAS(PGK1 )P[FBA1]-kivD\_LI(y)/deleção de ADH1. O plasmídeo foi digerido com PmeI e FseI e o fragmento grande de DNA foi

purificado em um gel de agarose seguido por um kit de extração de gel (Qiagen). O fragmento B de ADH1 foi amplificado a partir de pBP1181 com o iniciador oBP821 (SEQ ID NO: 407), que contém um sítio de restrição de PmeI, e o iniciador oBP484 (SEQ ID NO: 408), que contém um sítio de restrição de FseI. O produto de PCR do fragmento B de ADH1 foi digerido com PmeI e FseI e ligado com DNA ligase de T4 nos sítios correspondentes do fragmento grande de DNA purificado em gel. Um fragmento de PCR que corresponde ao 500bp de 3' de kivDJJ(y) foi clonado no vetor resultando para a deleção direcionada de kivD\_LI(y) em PNY1528. O fragmento foi amplificado a partir de pBP1181 com os iniciadores oBP822 (SEQ ID NO: 409), que contém um sítio de restrição de NotI, e oBP823 (SEQ ID NO: 410), que contém um sítio de restrição de PaeI. O fragmento foi digerido com NotI e PaeI e ligado com DNA ligase de T4 nos sítios correspondentes a jusante de URA3 no plasmídeo acima com a deleção de kivD\_LI(y) após a digestão com as enzimas de restrição apropriada. O plasmídeo resultante foi designado pBP1716.

[0526] A região de codificação de kivD a partir do códon de *Listeria grayi* otimizada para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 411), kivD\_Lg(y), foi sintetizada a partir de DNA2.0 (Menlo Park, CA). O kivD\_Lg(y) foi amplificado com os iniciadores oBP828 (SEQ ID NO: 412), que contém um sítio de restrição de PmeI, e oBP829 (SEQ ID NO: 413) que contém um sítio de restrição de PmeI. O produto de PCR resultante foi digerido com PmeI e ligado com DNA ligase de T4 no sítio correspondente em pBP1716 após a digestão com a enzima apropriada. A orientação do gene clonado foi verificada através da PCR com os iniciadores FBAP-F (SEQ ID NO: 414) e oBP829 (SEQ ID NO: 413). Um isolado com kivD\_Lg(y) na orientação correta foi designado pBP1719.

### **CONSTRUÇÃO DA CEPA PNY2259**

[0527] O cassete de integração de *kivD\_Lg(y)*/deleção de *kivD\_LI(y)* foi amplificado a partir de pBP1719 com os iniciadores oBP505 (SEQ ID NO: 201 ) e oBP823 (SEQ ID NO: 410). Células competentes do PNY2238 foram criadas e transformadas com o produto de PCR com o uso de um kit de Transformação II de Levedura Frozen-EZ (Zymo Research; Orange, CA). As misturas de transformação foram colocadas em placas em meios completos sintéticos carentes de uracila suplementados com 1% de etanol a 30C. As cepas de transformante foram submetidas a triagem através de PCR (JumpStart(TM) REDTaq (c) ReadyMix(TM)) com o uso dos iniciadores Ura3-end F (SEQ ID NO: 222) e HY-50 (SEQ ID NO: 415). Os transformantes foram cultivados em YPE (1% de etanol) e colocados em placas em um meio completo sintético suplementado com 1% de EtOH e que contém ácido 5-flúor-orótico (0,1%) a 30 C para selecionar isolados que perderam o marcado de URA3. A deleção de *kivDJJ(y)* e a integração de *kivD\_Lg(y)* foi confirmada através de PCR com os iniciadores HY-50 e oBP834 (SEQ ID NO: 416). Um isolado correto continha *kivD\_Lg(y)* no mesmo local e expresso a partir do mesmo promotor como *kivDJJ(y)* em PNY2238 foi designado PNY2259.

### **EXEMPLO 23**

#### **CONSTRUÇÃO DE DUAS BIBLIOTECAS DE GENE DE SATURAÇÃO DE SÍTIO PARA IDENTIFICAR AS VARIANTES COM A PREFERÊNCIA DE COFATOR PARA NADH**

[0528] No Exemplo 4, os iniciadores que têm o códon de degeneração NNK foram usados (N representa todos os 4 nucleotídeos A, C G e T enquanto K representa G e T). Nesse Exemplo, as misturas de iniciador que contêm iniciadores que codificam cada alteração de aminoácido individual de A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, V, W ou Y para as posições 53, 56 e 58 de KARI de K9 foram empregadas e as substituições para S, T, K e R foram excluídas como não preferenciais para essas posições. O tamanho da

biblioteca de saturação que direcionada aos três sítios de ligação de fosfato de NADPH (53, 56 e 58) de KARI de K9 é de 4.096 (em comparação com  $32 \times 32 \times 32$  ou 32.768 variantes que usam iniciadores de código de degeneração NNK conforme no Exemplo 4).

[0529] Um método de construção de biblioteca foi iniciado a partir da posição 58. As misturas de iniciador foram primeiramente criadas misturando-se todos os iniciadores que direcionam as mesmas posições (for exemplo, a mistura de iniciador, K9\_53f, foi criada misturando-se um mol igual de todos os 16 iniciadores diretos que direcionam a posição 53 (listados na tabela abaixo). De modo semelhante, o K9\_56f e o K9\_58f foram preparados. O iniciador reverso compartilhado é K9\_191G\_112210r (SEQ ID NO: 174): GGTTCAGTTTCGCCTCTGAAGGTAGTTTC (chamado de SR neste exemplo). A mutação na posição 58 foi primeiramente introduzida no AS6F1 através de PCR. O procedimento de mutagênese é semelhante àquele descrito no Exemplo 4. Em resumo, K9\_58f e SR foram fosforilados. Os iniciadores fosforilados foram então usados diretamente para introduzir uma mutação na posição 58 no AS6F1 com o uso do kit USB Change\_It (USB Corporation, Cleveland, OH, nº78480). O modelo foi removido com Dpn I. O produto de PCR limpo (Zymo DNA Clean & Concentrator-5; Zymo Research Corporation, Irvine, CA, Cat nºD4003) foi transformado em células KOBW-3a. Após um cultivo de um dia para o outro em placas de ágar de LB em um incubador a 37 °C, todas as células foram coletadas e o DNA foi extraído com o uso do kit Qiaprep Spin miniprep (Qiagen Inc. Valencia, CA, Cat nº27106).

[0530] O DNA extraído foi então usado como modelos para introduzir uma mutação na posição 56 com o uso de K9\_56f e SR como na mutagênese para a posição 58. Finalmente, a mutação na posição 53 foi introduzida de modo semelhante. Após as mutações em todas as três posições (53, 56 e 58) serem introduzidas no AS6F1, a nova biblioteca foi submetida a

triagem conforme aquela descrita no exemplo 4 e alguns mutantes selecionados são listados na tabela abaixo.

[0531] O outro método começou com a posição 53. A mistura de iniciadores K9\_56r e K9\_58r foi preparada de modo semelhante com o uso dos iniciadores listados na tabela abaixo). O iniciador direto compartilhado é pBAD\_266f: CTCTCTACTGTTTCTCCATACCCG (SEQ ID NO: 634; chamado de SF neste exemplo). A mutação na posição 53 foi primeiramente introduzida no AS6F1 através de PCR. O procedimento de mutagênese é semelhante àquele descrito acima com o uso de AS6F1 como o modelo e K9\_53f e SR como os dois iniciadores de PCR. O DNA que sofreu mutação resultante (na posição 53) foi usado como modelos e K9\_56r e SF foram usados como os iniciadores de mutagênese para introduzir uma mutação na posição 56. Finalmente, a mutação na posição 58 foi introduzida de modo semelhante com o uso de K9\_58r e SF. Após as mutações em todas as três posições (53, 56 e 58) serem introduzidas no AS6F1, a nova biblioteca foi submetida a triagem como descrito acima e alguns mutantes selecionados foram listados na tabela abaixo.

**TABELA 28. INICIADORES DIRETOS MUTACIONAIS.**

Posição/posições direcionada(s) de K9- <i>KARI</i>	Iniciadores
53	K9_53F_031411f GTTATCATCGGATTATTCGAAGGA (SEQ ID NO: 544) K9_53L_031411f GTTATCATCGGATTATTGGAAGGA (SEQ ID NO: 545) K9_53Y_031411f GTTATCATCGGATTATATGAAGGA (SEQ ID NO: 546) K9_53C_031411f GTTATCATCGGATTATGTGAAGGA (SEQ ID NO: 547) K9_53W_031411f GTTATCATCGGATTATGGGAAGGA (SEQ ID NO: 548) K9_53P_031411f GTTATCATCGGATTACCAGAAGGA (SEQ ID NO: 549) K9_53H_031411f GTTATCATCGGATTACATGAAGGA (SEQ ID NO: 550) K9_53Q_031411f GTTATCATCGGATTACAAGAAGGA (SEQ ID NO: 551) K9_53I_031411f GTTATCATCGGATTAATTGAAGGA (SEQ ID NO: 552) K9_53M_031411f GTTATCATCGGATTAATGGAAGGA (SEQ ID NO: 553) K9_53N_031411f GTTATCATCGGATTAAATGAAGGA (SEQ ID NO: 554) K9_53V_031411f GTTATCATCGGATTAGTTGAAGGA (SEQ ID NO: 555) K9_53A_031411f GTTATCATCGGATTAGCTGAAGGA (SEQ ID NO: 556) K9_53D_031411f GTTATCATCGGATTAGATGAAGGA (SEQ ID NO: 557) K9_53E_031411f GTTATCATCGGATTAGAAGAAGGA (SEQ ID NO: 558) K9_53G_031411f GTTATCATCGGATTAGGTGAAGGA (SEQ ID NO: 559)

Posição/posições direcionada(s) de K9- KARI	Iniciadores
56	K9_56F_031411f GGATTACCTGAAGGATTCAAA (SEQ ID NO: 560) K9_56L_031411f GGATTACCTGAAGGATTGAAA (SEQ ID NO: 561) K9_56Y_031411f GGATTACCTGAAGGATATAAA (SEQ ID NO: 562) K9_56C_031411f GGATTACCTGAAGGATGTAAA (SEQ ID NO: 563) K9_56W_031411f GGATTACCTGAAGGATGGAAA (SEQ ID NO: 564) K9_56P_031411f GGATTACCTGAAGGACCAAAA (SEQ ID NO: 565) K9_56H_031411f GGATTACCTGAAGGACATAAA (SEQ ID NO: 566) K9_56Q_031411f GGATTACCTGAAGGACAAAAA (SEQ ID NO: 567) K9_56I_031411f GGATTACCTGAAGGAATTTAAA (SEQ ID NO: 568) K9_56M_031411f GGATTACCTGAAGGAATGAAA (SEQ ID NO: 569) K9_56N_031411f GGATTACCTGAAGGAAATAAA (SEQ ID NO: 570) K9_56V_031411f GGATTACCTGAAGGAGTTAAA (SEQ ID NO: 571) K9_56A_031411f GGATTACCTGAAGGAGCTAAA (SEQ ID NO: 572) K9_56D_031411f GGATTACCTGAAGGAGATAAA (SEQ ID NO: 573) K9_56E_031411f GGATTACCTGAAGGAGAAAAA (SEQ ID NO: 574) K9_56G_031411f GGATTACCTGAAGGAGGTAAA (SEQ ID NO: 575)
58	K9_58F_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAATTCTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 57) K9_58L_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAATTGTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 577) K9_58Y_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAATATTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 578) K9_58C_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAATGTTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 579) K9_58W_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAATGGTGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 580) K9_58P_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAACCATGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 581) K9_58H_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAACATTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 582) K9_58Q_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAACAATGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 583) K9_58I_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAAAATTTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 584) K9_58M_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAATGTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 585) K9_58N_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAAAATTTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 586) K9_58V_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAAGTTTGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 587) K9_58A_051611f GATTACCTGAAGGATTT AAAGCTTGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 588) K9_58D_051611f GATTACCTGAAGGATTT AAAGATTGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 589) K9_58E_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAAGAATGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 590) K9_58G_051611f GATTACCTGAAGGATTTAAAGTTGGAAGAGAGC (SEQ ID NO: 591)

**TABELA 29. INICIADORES DIRETOS MUTACIONAIS.**

Posição/posições de K9-KARI	Iniciadores
56	K9_56F_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTGAATCCTTC (SEQ ID NO: 592) K9_56L_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTCAATCCTTC (SEQ ID NO: 593) K9_56Y_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTATATCCTTC (SEQ ID NO: 594) K9_56C_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTACATCCTTC (SEQ ID NO: 595) K9_56W_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTCCATCCTTC (SEQ ID NO: 596) K9_56P_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTGGTCCTTC (SEQ ID NO: 597) K9_56H_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTATGTCCTTC (SEQ ID NO: 598) K9_56Q_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTGTGTCCTTC (SEQ ID NO: 599) K9_56I_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTAATTCCTTC (SEQ ID NO: 600) K9_56M_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTCATTCCTTC (SEQ ID NO: 601) K9_56N_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTATTCCTTC (SEQ ID NO: 602) K9_56V_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTAACTCCTTC (SEQ ID NO: 603) K9_56A_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTAGCTCCTTC (SEQ ID NO: 604) K9_56D_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTATCTCCTTC (SEQ ID NO: 605) K9_56E_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTTCTCCTTC (SEQ ID NO: 606)



Posição/posições direcionada(s) de K9-KARI	Iniciadores
	K9_56G-_071211r GCTCTCTTCCATGGTTTACCTCCTTC (SEQ ID NO: 607)
58	K9_58F_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAGAATTT (SEQ ID NO: 608) K9_58L_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCACAATTT (SEQ ID NO: 609) K9_58Y_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAATATTT (SEQ ID NO: 610) K9_58C_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAACATTT (SEQ ID NO: 611) K9_58W_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCACCATTT (SEQ ID NO: 612) K9_58P_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCATGGTTT (SEQ ID NO: 613) K9_58H_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAATGTTT (SEQ ID NO: 614) K9_58Q_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCATTGTTT (SEQ ID NO: 615) K9_58I_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAAATTTT (SEQ ID NO: 616) K9_58M_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCACATTTT (SEQ ID NO: 617) K9_58N_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAATTTTT (SEQ ID NO: 618) K9_58V_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAAACTTT (SEQ ID NO: 619) K9_58A_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAAGCTTT (SEQ ID NO: 620) K9_58D_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAATCTTT (SEQ ID NO: 621) K9_58E_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCATTCTTT (SEQ ID NO: 622) K9_58G_071211r GTTCTTCTGCTCTCTTCCAACCTTT (SEQ ID NO: 623)

**TABELA 30. LISTA DE ALGUNS MUTANTES COM OS VALORES DE  $K_M$  MEDIDOS DOS**

**MESMOS**

Mutante	SEQ ID NO: ácido nucleico, aminoácido	Mutações	KM ( $\mu$ M) de (NADH)	KM ( $\mu$ M) de (NADPH)
K9 Wt	26, 27	--	326	0,2
BI7D12	625, 624	Y53Q, S56V, S58D, I86V, N87P, T131M, T191G	39	196
BI10F1	627, 626	Y53E, S56V, S58D, I86V, N87P, T131M, T191G	74	573
BJ6G6	629, 628	Y53P, S56D, S58Q, I86V, N87P, T131M, T191G	298	672
BJ7D6	631, 630	Y53P, S56V, S58E, I86V, N87P, T131M, T191G	37	236
BJ7F7	633, 632	Y53A, S56D, S58D, I86V, N87P, T131M, T191G	296	762

**EXEMPLO 24**

**CONSTRUÇÃO DE UMA CEPA ALD6 $\Delta$  E DERIVADOS DE PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL**

[0532] Um fragmento de DNA de 5,3 kb (BglII/EcoRV) do pRS426::GPD- xpk1+ADH-eutD (SEQ ID NO: 383) que contém cassetes de expressão para os genes xpk1 e eutD de *Lactobacillus plantarum* foi adicionado entre as sequências de divisa de ALD6, no sítio SnaBI do vetor de pUC19::ald6D::loxP-URA3-loxP descrito no Exemplo 9, acima. A reação de ligação foi transformada nas células de Stbl3 de *E. coli*, que foram incubadas em placas de placas de LB Amp para selecionar transformantes. A inserção do

cassete de xpkI-eutD foi confirmada através de PCR (iniciadores). Um clone positivo (pUC19::Aald6::URA3::xpkS) foi obtido.

[0533] O vetor descrito acima foi linearizado com AhdI e transformado em células de PNY1507 (descritas no presente documento) preparadas com o Kit de Transformação de Levedura Frozen-EZ da Zymo Research (Cat. No. T2001) com uma modificação ao protocolo do fabricante que inclui uma incubação de resultado adicional de 2,5 horas em 2,0 ml de meio de YPE (extrato de levedura, peptona com 1% de etanol). Os transformantes foram obtidos através de disposição em placa em um meio completo sintético sem uracila que forneceu 1% de etanol como a fonte de carbono. Os transformantes remendados foram submetidos a triagem através de PCR para confirmar a deleção/integração, com o uso de iniciadores N1090 e N1213 (SEQ ID NOs: 779 e 242). Um plasmídeo que porta Cre recombinase (pRS423::GAL1p-Cre; SEQ ID nº 271) foi transformada na cepa com o uso seleção de marcador de histidina. Os transformantes foram passados em YPE suplementado com 0,5% de galactose. As colônias foram submetidas a triagem para resistência a 5-FOA (perda de marcador de URA3) e para auxotrofia de histidina (perda do plasmídeo de Cre). A remoção apropriada do gene de URA3 através dos sítios de loxP de divisa foi confirmada através de PCR com os iniciadores N1212 e N1214 (SEQ ID NOs: 241 e 281). Finalmente, o plasmídeo de integração de alsS (SEQ ID NO: 780) foi transformado nessa cepa com o uso do marcador de seleção de geneticina incluído. Os integrantes foram confirmados com o uso dos iniciadores N160SeqF5 e oBP512 (SEQ ID NO: 388 e 337).

[0534] Os plasmídeos pYZ090AalsS e pBP915 (SEQ ID NOs: 371 e 182) foram transformados na cepa através da transformação de acetato de lítio (Protocolo nº 2 em "Methods in Yeast Genetics", 2005. Amberg, Burke e Strathern). Os transformantes foram selecionados através da disposição em

placas em um meio completo sintético sem histidina e uracila com etanol como a fonte de carbono. Os transformantes foram remendados e em seguida remendados novamente em um meio completo sintético sem histidina e uracila com 2% de glicose e 0,05% de etanol. Seis clones foram avaliados para cultivo e produção de isobutanol. Um desses foi designado PNY2216.

### **EXEMPLO 25**

#### **DELEÇÃO DE YMR226C A PARTIR DA CEPA PNY2211 DE *S. CEREVISIAE* (CONSTRUÇÃO DE PNY2248)**

[0535] O gene YMR226c foi deletado da cepa PNY2211 de *S. cerevisiae* (descrita no Exemplo 9) através de recombinação homóloga com o uso de um cassete de deleção baseado em KanMX4 linear amplificado por PCR disponível na cepa BY4743 ymr226cΔ::KanMX4 de *S. cerevisiae* (ATCC 4020812). Os iniciadores de PCR diretos e reversos N1237 (SEQ ID NO: 784) e N1238 (SEQ ID NO: 785) amplificaram um cassete de deleção de 2,051 bp de ymr226cΔ::KanMX4 do cromossomo XIII. O produto de PCR conteve sequências a montante e a jusante de 253 e 217 bp, respectivamente, provocando a divisa do cassete de deleção de ymr226cΔ::KanMX4, que são 100% homólogas às sequências que provocam a divisa do local de YMR226c nativo na cepa PNY2211. A recombinação e a troca genética ocorrem nas sequências homólogas de divisa que deletam de modo eficaz o gene de YMR226c e que integram o cassete de deleção de ymr226cΔ::KanMX4.

[0536] Aproximadamente 2,0 µg do produto amplificado por PCR foi transformado na cepa PNY2211 tornada competente com o uso do método de acetato de lítio anteriormente descrito em *Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, páginas 201 a 202 (2005)), e a mistura de transformação foi disposta em placas em YPE mais geneticina (50 µg/ml) e incubada a 30 °C para a seleção de células com um cassete de ymr226cΔ::KanMX4 integrado. Os transformantes foram submetidos a

triagem para ymr226cΔ::KanMX4 através de PCR, com um iniciador N1240 interno específico para cassete de deleção de KanMX4 voltado para fora de 5' (SEQ ID NO: 786) pareado com um iniciador N1239 específico para cromossomo voltado para dentro de divisa (SEQ ID NO: 243) e um iniciador N1241 específico para cassete de deleção de KanMX4 voltado para fora de 3' (SEQ ID NO: 787) pareado com um iniciador N1242 específico para cromossomo voltado para dentro de divisa (SEQ ID NO: 244). Os clones de ymr226cΔ::KanMX4 PNY2211 positivos foram obtidos, um dos quais foi designado PNY2248.

### **EXEMPLO 26**

#### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL COM RENDIMENTO DE DHMB DIMINUÍDO EM NOCAUTE DE YMR226C**

[0537] Os transformantes de ymr226cA::KanMX4 de PNY2211 e um controle de não deleção (PNY2211 com YMR226c nativo) foram testados para produção de butanol em um meio de glicose introduzindo-se, primeiramente, os plasmídeos que contém via de isobutanol pYZ090ΔalsS (SEQ ID NO: 371) e pBP915 (SEQ ID NO: 182) simultaneamente através do método de transformação de acetato de lítio Rápido e Sujo descrito em Methods in Yeast Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2005)). A seleção de plasmídeo foi baseada na auxotrofia de histidina e uracila em placas de seleção que contém etanol (meio completo sintético com 1,0% de etanol -his -ura). Após três a cinco dias, diversos transformantes que mostram o cultivo mais robusto foram adaptados para meio de glicose remendando-se ao SD de 2,0% de glicose + 0,05% de etanol -his -ura e incubados por 48 a 72 horas a 300 °C. Três marcas com listras que mostram o cultivo mais robusto foram usadas para inocular uma 10 ml de cultura de semente em SD de 0,2% glicose + 0,2% de etanol -his -ura em 125 ml de frascos ventilados e cultivadas a 30 °C, 250 rpm por aproximadamente 24 horas. As células foram então subcultivadas no meio completo sintético com

2% de glicose + 0,05% de etanol -his -ura em 125 ml de frascos tampados hermeticamente e incubados por 48 horas a 30 °C. Os sobrenadantes de cultura coletados após a inoculação e após 48 horas de incubação foram analisados através de HPLC para determinar a produção de isobutanol e através de LC/MS para quantificar o DHMB. Observou-se que as cepas de controles produzem DHMB em um rendimento molar de 0,03 a 0,07 mol por mol de glicose. Um pico que corresponde ao DHMB não foi observado em sobrenadantes de cultura das cepas ymr226cA, um dos quais foi designado PNY2249.

### **EXEMPLO 27**

#### **IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS DE ATIVIDADE DE ACETOLACTATO**

##### **REDUTASE (ALR) COM O USO DA BIBLIOTECA DE NOCAUTE DE LEVEDURA**

[0538] A partir de uma coleção de nocaute ("KO") de >6.000 cepas de levedura derivadas da cepa BY4743, disponível pela Open Biosystems® (um divisão da Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 95 cepas de nocaute de gente de desidrogenase candidatas foram escolhidas. As culturas de partida de cepas de nocaute foram cultivadas em placas de poço profundo de 96 poços (Costar 3960, Corning Inc., Corning NY, ou semelhantes) em YPD de meio rico, e subcultivadas em um OD 600nm de partida de ~0,3 em um meio que contém 0,67% de Base de Nitrogênio de Levedura, 0,1% de casaminoácidos, 2% de glicose, e 0,1 M de K<sup>+</sup>-MES, pH 5,5. As amostras foram tiradas ao longo de um período de 5 dias para mensurações de DHMB e DHIV. O DHIV e os dois isômeros de DHMB foram separados e quantificados através de cromatografia líquida/espectrometria de massa ("LC/MS") em um sistema AcquityTQD da Waters (Milford, MA), com o uso de uma coluna Atlantis T3 (parte nº 186003539). A coluna foi mantida a 30 °C, e a taxa de fluxo foi de 0,5 ml/min. A fase móvel A foi 0,1% de ácido fórmico em água, e a fase móvel B foi 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. Cada operação consistiu de 1 minuto a 99% de A, um gradiente linear sobre 1 minuto para 25%

de B, seguido de 1 minuto a 99% de A. O efluente da coluna foi monitorado para picos a  $m/z = 133$  (ESI negativa), com tensão de cone de 32,5 V, através do detector de espectros de massa ACQ\_TQD da Waters (s/n QBA688). O assim chamado "DHMB rápido" tipicamente surgiu em 1,10 minuto, seguido do DHIV em 1,2 minuto, e o DHMB "lento" surgiu em 1,75 minuto. A separação de linha de base foi obtida e as áreas de pico para o DHIV foram convertidas para  $\mu\text{M}$  de concentrações de DHIV através de referência às análises de soluções de padrões criadas a partir de um estoque aquoso de 1 M. Essas mensurações mostraram que a maior parte das mudanças nos níveis de DHMB ocorreu nas primeiras 48 a 60 horas, conseqüentemente uma única amostra foi coletada aproximadamente naquele tempo em experimentos subsequentes. Nesse experimento, o DHMB rápido foi constatado em níveis muito mais altos que o DHMB lento, o que nem sempre foi detectável. A relação de DHIV para DHMB rápido na maior parte das culturas foi  $\sim 3$ , mas uma cepa carente do gene de YMR226C mostrou de modo consistente níveis muito baixos de DHMB rápido, e DHIV normal, de modo que a relação de DHIV/DHMB rápido foi de cerca de 100. Isso sugeriu que o YMR226Cp é a ALR principal nessa base.

[0539] Para confirmar que YMR226Cp é a ALR principal nessa base, os níveis *in vitro* de ALR e KARI foram testados na cepa de deleção de *ymr226c* (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas VA, ATCC nº4020812) e seu pai, BY4743 (ATCC nº201390; American Type Culture Collection, Manassas VA). Tubos de cinquenta ml que contêm 6 ml de YPD foram inoculados a partir de placas de ágar de YPD e permitidos a crescer de um dia para o outro (30 °C, 250 rpm). As células foram peletizadas, lavadas uma vez em água e suspensas novamente em 1 ml de tampão de citoplasma de levedura (Van Eunen *et al.* *FEBS Journal* 277: 749 a 760 (2010)) que contém um coquetel de inibidor de protease de levedura (Roche, Basel, Switzerland, Cat nº 11836170001, usado conforme direcionado pelo

forneceador, 1 tablete por 10 mls de tampão). Tolueno (0,02 ml, Fisher Scientific, Fair Lawn NJ) foi adicionado, e os tubos foram agitados em velocidade superior por 10 minutos em um agitador Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia NY, Model G-560) para permeabilização. Os tubos foram colocados em um banho de água a 30 °C, e os substratos foram adicionados às seguintes concentrações finais: (S)-acetolactato (criado enzimaticamente conforme descrito abaixo no Exemplo 29) para NADPH 9,4 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), 0,2 mM mais um sistema de regeneração de NAD(P)H que consiste em ~ 10 mM de glicose-6-fosfato e 2,5 U/ml de glicose-6-fosfato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma, St. Louis, MO, Cat nº G8404). Em intervalos temporizados, as alíquotas (0,15 ml) foram adicionados a 0,15 ml de alíquotas de 2% de ácido fórmico para interromper a reação. As amostras foram então analisadas para DHIV e ambos os isômeros de DHMB através de LC/MS conforme descrito acima; apenas o DHMB e DHIV foram observados. As atividades específicas das duas enzimas nas duas cepas são mostradas na Tabela 31.

**TABELA 31. ATIVIDADES DE ENZIMA ALR E KARI**

Cepa	KARI	ALR
BY4743	1,7 mU/mg de proteína	20 mU/mg
cepa de deleção de YMR226C	2,2 mU/mg de proteína	0,1 mU/mg

[0540] Os dados sugerem que o produto de gene de YMR226C foi responsável por >99% da atividade de ALR.

### **EXEMPLO 28**

#### **IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS DE ATIVIDADE DE ACETOLACTASE REDUTASE (ALR) QUE USAM A BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO EXCESSIVA DE LEVEDURA**

[0541] A partir de uma coleção de "Levedura ORF" de >5.000 transformantes de Y258, cada um com um plasmídeo que porta um gene

de levedura conhecido mais uma etiqueta de terminal C, sob o controle de um promotor induzível (Open Biosystems®, uma divisão da Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), noventa e seis cepas com plasmídeos que contêm genes associados à atividade de desidrogenase foram cultivadas em formato de 96 poços através da adaptação protocolo de indução e cultivo recomendado pelo fornecedor (Open Biosystems®). As células foram peletizadas e permeabilizadas com Tolueno conforme descrito acima, e uma mistura de substrato concentrada foi adicionada para proporcionar concentrações finais conforme no Exemplo 27. As amostras temporizadas foram tiradas e analisadas para DHIV e ambos os isômeros de DHMB. As relações da ALR/KARI foram calculadas e comparadas. As cepas com relações elevadas foram candidatas para a produção excessiva de atividades de ALR. Quando os dados para taxas relativas de formação de DHIV e DHMB rápido foram exibidos em um diagrama de caixa da Minitab® (Microsoft Inc., Redmond, WA), metade das relações esteve entre ~9 a 13, e a maior parte do resto esteve entre 3 e 19. As exceções identificadas como valores atípicos incluíram YER081W, YIL074C, YMR226C, YBR006W e YOR375C, para as quais as relações de ALR/KARI esteve entre 22 e 40. Em uma análise semelhante de taxas relativas de formação de DHIV de DHMB lento, metade das relações esteve entre 9 e 11, mas YMR226C, YPL275W, YER081W e YOL059W apareceram como valores atípicos, com relações entre 13 e 25. Portanto, a superexpressão de YMR226C e YER081W aumentou a síntese de ambos os DHMBs. Além disso, YIL074C, YBR006W e YOR375C aumentaram a síntese de DHMB rápido, e YPL275W e YOL059W aumentaram a síntese de DHMB lento. As sequências de DNA genômico (que podem incluir íntrons) e as sequências de tradução de ORF de genes identificadas na superexpressão são fornecidas na Tabela 6.



**EXEMPLO 29****INIBIÇÃO DE KARI POR DHMB****PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE (S)-ACETOLACTATO**

[0542] O (S)-acetolactato foi usado como um material de partida para a síntese de DHMB. O (S)-acetolactato foi criado enzimaticamente, como segue. Uma cepa TOP10 de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) modificada para expressar BudB de *Klebsiella* (anteriormente descrita na Patente nº U.S. 7.851.188, a qual está integralmente incorporada no presente documento a título de referência; consulte o Exemplo 9 daquela patente) sob o controle de IPTG foi usada como uma fonte de enzima. A mesma foi cultivada em 200 a 1.000 ml de volumes de cultura. Por exemplo, 200 ml foram cultivados em Caldo Luria (Meiostech, Manassas, VA) que contém 0,1 mg/ml de Ampicilina (Sigma, St. Louis, MO) em um frasco cônico de 0,5 l, o qual foi agitado a 250 rpm a 37 °C. Em OD 600 ~0,4, o isopropiltiogalactosídeo (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado a 0,4 mM, e o cultivo foi continuado por 2 horas antes das células serem coletadas por centrifugação, rendendo ~ 1 gr de células de peso úmido. De modo similar, purificações parciais foram conduzidas em escalas de -0,5 a 5 gr de células húmidas. Por exemplo, -0,5 g de células foram suspensas em 2,5 ml de tampão que contém Na-MES 25 mM de pH 6, rompidas através de sonicação a 0 °C, e clarificadas por centrifugação. O extrato bruto foi suplementado com pirofosfato de tiamina 0,1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e EDTA 1 mM (todas da Sigma, St. Louis, MO). Em seguida, 0,07 ml de sulfato de estreptomicina aquosa a 10% em p/v (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado e a amostra foi aquecida em um banho de água a 56 °C por 20 minutos. Isso foi clarificado por centrifugação, e sulfato de amônio foi adicionado a 50% de saturação. A mistura foi centrifugada, e a pélete foi criada em 0,5 ml de Na-MES 25 mM, pH 6,2, e usada sem caracterização adicional. Sínteses de acetolactato também foram conduzidas em várias escalas. Uma preparação

grande foi conduzida como segue: 5,5 g de piruvato de sódio foram dissolvidos em Na-MES 25 mM, pH 6,2, para ~45 ml e suplementados com  $\text{MgCl}_2$  10 mM, pirofosfato de tiamina 1 mM, EDTA 1 mM (todas da Sigma, St. Louis, MO), acetato de sódio 25 mM (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ), e 0,25 ml de uma preparação de BudB. A mistura foi agitada sob um medidor de pH em temperatura ambiente. À medida que a reação prosseguiu,  $\text{CO}_2$  foi desenvolvido, e o pH cresceu. Ácido pirúvico (Alfa, Ward Hill, MA) foi adicionado lentamente através de uma bomba peristáltica para manter o pH entre 6 e 7. À medida que o pH cresce, a reação de enzima tem a velocidade reduzida, mas se permitida a cair para abaixo de 6, a descarboxilação de ácido acetoláctico se torna um problema. Quando a reação foi concluída, a mistura foi armazenada a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **SÍNTESE DE DHMB**

[0543] O DHMB foi sintetizado quimicamente a partir de (S)-acetolactato. Três ml de uma preparação de acetolactato bruto a ~0,8 M em pH ~8 foram tratados com 1,2 de  $\text{NaBH}_4$  equivalente (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI). A reação foi permitida a repousar em temperatura ambiente de um dia para o outro antes de ser dividida em duas e dessalinizada em duas porções em uma coluna de diâmetro de 60 cm x 1 cm de Biogel P-2 (Bio-Rad, Hercules, CA) com o uso de água como a fase móvel. As frações que contêm DHMBs misturados foram concentradas através de evaporação rotativa e ajustadas a um pH 2,2 com ácido sulfúrico.

[0544] Os diastereômeros de DHMB foram separados com o uso de um sistema de HPLC (que consiste em uma bomba de LKB 2249 e um controlador de gradiente (LKB, agora uma divisão da General Electric, Chalfont St Giles, UK) e um detector de UV/vis 1040A da Hewlett- Packard (agora Agilent, Santa Clara, CA) com uma Waters Atlantis T3 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm) operada em temperatura ambiente em 0,2% de ácido fórmico aquoso, pH 2,5, a

uma taxa de fluxo de 0,3 ml/min, com uma detecção de UV a 215 nm. O DHMB "rápido" foi eluído em 8,1 minutos e o DHMB "lento" foi eluído em 13,7 minutos. O DHIV não estava presente. As frações reunidas foram tiradas próxima à secura, e coevaporadas com Tolueno para remover o ácido fórmico residual. O resíduo foi então dissolvido em água e tornado básico com trietilamina (Fisher, Fair Lawn, NJ).

#### **DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO E ESTRUTURA ABSOLUTA DE DHMB**

[0545] A concentração de soluções de DHMB purificadas foi determinada como segue. A concentração foi estimada com base no mmol de acetolactato usado na redução de NaBH<sub>4</sub>. Às porções dos DHMBs, foi adicionada uma quantia conhecida de benzoato de sódio (criado dissolvendo-se ácido benzoico sólido (grau ACS, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) em NaOH aquoso)) para proporcionar misturas de dois componentes em quantidades (aproximadamente) equimolares. Uma amostra semelhante de DHIV também foi preparada a partir do sal de sódio sólido obtido através de síntese habitual (Albany Molecular Research, Albany NY). As amostras foram coevaporadas diversas vezes com D<sub>2</sub>O (Aldrich, Milwaukee, WI) e redissolvidas em D<sub>2</sub>O. Espectros de NMR de próton integrados foram obtidos e usados para determinar a relação molar de DHIV ou DHMB para benzoato. A comparação dos espectros de NMR dos DHMBs com os espectros da literatura para os ácidos livres em CDCl<sub>3</sub> (Kaneko *et al.*, *Phytochemistry* 39: 115 a 120 (1995)) mostrou que o DHMB rápido foi o isômero eritro. Visto que acetolactato sintetizado enzimaticamente tem a configuração de (S) em C-2, o DHMB rápido tem a configuração de 2S, 3S. O DHMB lento tem a configuração de treó 2S, 3R.

[0546] As diluições das amostras de NMR também foram analisadas através de LC/MS com o uso de soluções de ácido benzoico preparadas separadamente com padrões. O ácido benzoico, o DHIV e os dois

isômeros de DHMB foram separados e quantificados através de LC/MS em um sistema AcquityTQD da Waters (Milford, MA), com o uso de uma coluna Atlantis T3 (parte nº186003539), conforme descrito acima. O ácido benzoico foi detectado em  $m/z=121$  (ESI negativa), e surgiu em 2,05 minutos. A concentração de benzoato nas misturas estava dentro da incerteza experimental do valor esperado. O experimento mostrou, ainda, que ambos os isômeros de DHMB tiveram ~80% da sensibilidade de DHIV em LC/MS (isto é, a área de pico de MS observada/nmol injetado) ao longo da faixa de resposta do instrumento. Portanto, sem um padrão de DHIV é usado para quantificar o DHMB constatado em extratos de célula ou em reações enzimáticas, as concentrações de DHMB aparentes precisam ser multiplicadas por 1,25.

#### **MEDIÇÃO DA INIBIÇÃO DE KARI POR DHMB**

[0547] KARI purificada codificada por genes a partir de ou *Lactococcus lactis* (SEQ ID NO: 864), um derivado de KARI *Pseudomonas fluorescens* conhecida como JEA1 (SEQ ID NO: 799; Publicação de Pedido nº US 2010/0197519, que é incorporado ao presente documento como um título de referência em sua totalidade), ou uma variante de KARI *Anaerostipes caccae* conhecida como K9D3 (SEQ ID NO:788), foi testada por sua sensibilidade a inibição por DHMB em ensaios espectrofotométricos em um instrumento UV160U Shimadzu (Quioto, Japão) com uma unidade de controle de temperatura TCC240A, ajustada em 30 °C. O tampão foi K<sup>+</sup> Hepes 0,1 M, pH 6,8, contendo MgCl<sub>2</sub> 10 mM e EDTA 1 mM. NADPH estava presente em 0,2 mM, e acetolactato racêmico estava presente ou em isômero (S) 3 mM ou 0,725 mM. A taxa de oxidação de NADPH na presença e ausência de DHMB rápido ou devagar foi medida.  $V_{\max}$  para cada amostra foi calculada a partir da taxa observada e do  $K_M$  de acetolactato conhecido com uso da equação de Michaelis-Menten. Um  $K_i$  volumétrico foi estimado para cada medição na presença de DHMB com uso da equação Michaelis-Menten como modificado

para inibição competitiva vs. acetolactato (o termo  $K_M$  na equação de Michaelis-Menten é multiplicado por  $(1 + [I]/K_i)$  e a equação é solucionada para  $K_i$ . Os resultados foram convertidos para mM mediante o término do experimento RMN e são mostrados na Tabela 32.

**TABELA 32. VALORES  $K_i$  PARA INIBIÇÃO DE KARI POR ISÔMEROS DE DHMB**

Cepa	DHMB rápido	DHMB lento
JEA1	0,23 mM	0,23 mM
K9D3	0,3 mM	0,2 mM
<i>L. lactis</i>	2,8 mM	2,3 mM

### **EXEMPLO 30**

#### **INIBIÇÃO DE DHAD POR DHMB**

[0548] Ácido diidrôxi desidratase purificado (DHAD) a partir de *Staphylococcus mutans* foi testado para inibição de conversão de diidrôxi isovalerato (DHIV) em 2-cetoisovalerato (2-KIV) por DHMB com uso de uma modificação de um ensaio colorimétrico conforme descrito por Szamosi *et al.*, *Plant Phys.* 101: 999 a 1.004 (1993). O ensaio ocorreu em um tubo Eppendorf de 2 ml colocado em um bloco de aquecimento mantido em 30 °C. A mistura de ensaio tinha um volume final de 0,8 ml contendo tampão Hepes-KOH 100 mM, pH 6,8,  $MgCl_2$  10 mM, DHIV 0,5 a 10 mM, DHMB 0 a 40 mM e 18 µg de DHAD. O ensaio foi iniciado com a adição de uma matéria concentrada dez vezes de substrato. As amostras foram removidas (0,35 ml) em momentos 0,1 e 30 minutos e a reação foi interrompida pela mistura em 0,35 ml de 0,1 N de HCl com 0,05% de 2,4-dinitrofenilhidrazina (Aldrich) em um segundo tubo de Eppendorf. Após a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, 0,35 ml de 4N de NaOH foi adicionado à mistura, misturado e centrifugado a 15.000xG por 2 minutos em uma centrífuga (Microcentrífuga da Beckman-Coulter 18). A absorvância da solução em 540 nm foi medida, então, em uma cubeta de comprimento de trajeto de 1 cm com uso de um espectrofotômetro (Varian) Cary 300 Bio UV-Vis. Com base em uma curva padrão que utiliza 2-

KIV autêntico (Fluka), absorvância de 1 OD em 540 nm é produzida por 2-KIV 0,28 mM. A taxa de formação de 2-KIV foi medida na presença e ausência de DHMB rápido ou lento. Ambas as formas de DHMB se comportaram como inibidores competitivos de DHIV. Suas constantes de inibição ( $K_i$ ) foram calculadas a partir da equação de Michaelis-Menten para inibição competitiva simples :  $v = S \cdot V_{\max} / (S + K \cdot (1 + I/K_j))$ , em que  $v$  é a taxa medida da formação de 2-KIV,  $S$  é a concentração inicial de DHIV,  $V_{\max}$  é a taxa máxima calculada a partir da taxa observada em DHIV 10 mM e nenhum DHMB,  $K_M$  é uma constante previamente medida de 0,5 mM, e  $I$  é a concentração de DHMB. Os isômeros rápidos e lentos de DHMB tiveram constantes de inibição calculadas de 7 mM e 5 mM, respectivamente.

### **EXEMPLO 31**

#### **IDENTIFICAÇÃO DE HOMÓLOGOS DE YMR226C**

[0549] Os homólogos do gene YMR226C de *Saccharomyces cerevisiae* foram procurados por buscas do tipo BLAST do banco de dados de nucleotídeo não redundante GenBank ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), a ferramenta de busca do tipo BLAST de genomas de fungos no banco de dados *Saccharomyces* Genome ([www.leveduragenome.org/cgi-bin/blast-fungal.pl](http://www.leveduragenome.org/cgi-bin/blast-fungal.pl)) e a ferramenta do tipo BLAST do Genolevures Project ([genolevures.org/blast.html#](http://genolevures.org/blast.html#)). Sequências únicas de 18 espécies de levedura que mostram identidade de sequência alta com YMR226C foram identificadas e o ORF completo para esses genes foi recuperado a partir do registro aderido no banco de dados associado. As sequências de polipeptídeo codificadas por esses ORFs foram determinadas pelo recurso de Translação de Vetor NTI (Invitrogen, Carlsbad CA). As sequências de polipeptídeo e polinucleotídeo são mostradas abaixo na Tabela 33. As espécies de levedura, número de acesso ao banco de dados de nucleotídeo e sequências de DNA e proteína são dadas na Tabela. A sequência *S. kluyveri* está no banco de dados Genolevures sob o número de

acesso dado; os outros estão em GenBank. As identidades de porcentagem entre as sequências são mostradas na Tabela 34.

[0550] Os 18 ORFs foram alinhados com uso de AlignX (Vetor NTI; o gene que codifica uma desidrogenase dependente de NADP<sup>+</sup> putativo de *Neurospora crassa* (XM\_957621, identificada na busca do tipo BLAST no GenBank com uso da sequência de nucleotídeo YMR226C) foi utilizado como um grupo de saída). A árvore filogenética resultante é mostrada na Figura 11 e um alinhamento de sequência é mostrado na Figura 12.

[0551] A identidade de sequência desses homólogos com YMR226C se encontra na faixa de um mínimo de 55% (*Yarrowia lipolytica* e *Schizosaccharomyces pombe*) a um máximo de 90% (*S. paradoxus*). Uma busca do tipo BLAST também foi revelada em um cDNA de *S. pastorianus* (número de acesso CJ997537) com 92% de identidade de sequência em 484 pares de base, porém, visto que essa espécie é um híbrido entre *S. bayanus* (cujo homólogo YMR226C mostra 82% de identidade com a sequência de *S. cerevisiae*), e devido a somente uma sequência de ORF parcial estar disponível, essa sequência não foi incluída na comparação. Quando a sequência de YMR226C da cepa S288C de laboratório canônica foi comparada às sequências de 12 outras cepas de *S. cerevisiae*, somente 4 polimorfismos de um único nucleotídeo são encontrados (identidade de sequência 99,5%), indicando que esse é um gene altamente conservado naquela espécie.

**TABELA 33: HOMÓLOGOS DE LEVEDURA YMR226C**

Espécie	Número de Acesso (data de acesso ao banco de dados)	SEQ ID NO do ácido nucleico	SEQ ID NO do aminoácido
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	AABY01000127 (3/7/2011)	698	699
<i>Saccharomyces bayanus</i>	AACA01000631 (3/7/2011)	700	701
<i>Saccharomyces castellii</i>	AACF01000116 (3/7/2011)	702	703
<i>Saccharomyces mikatae</i>	AACH01000019 (3/7/2011)	704	705

Espécie	Número de Acesso (data de acesso ao banco de dados)	SEQ ID NO do ácido nucleico	SEQ ID NO do aminoácido
<i>Ashbya gossypii</i>	AE016819 (3/7/2011)	706	707
<i>Candida glabrata</i>	CR380959 (3/7/2011)	708	709
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CR382139 (3/7/2011)	710	711
<i>Scheffersomyces stipitis</i> (anteriormente <i>Pichia stipitis</i> )	XM_001387479 (3/7/2011)	712	713
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (anteriormente <i>Pichia guilliermondii</i> )	XM_001482184 (3/7/2011)	714	715
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> (antigamente <i>Kluyveromyces polysporus</i> )	XM_001645671 (3/4/2011)	716	717
<i>Candida dubliniensis</i>	XM_002419771 (3/7/2011)	718	719
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	XM_002494574 (3/7/2011)	720	721
<i>Lachancea thermotolerans</i> (Antigamente <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> )	XM_002553230 (3/4/2011)	722	723
<i>Kluyveromyces lactis</i>	XM_451902 (3/4/2011)	724	725
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	SAKL0H04730 (3/7/2011)	726	727
<i>Yarrowia lipolytica</i>	XM_501554 (3/8/2011)	728	729
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NM_001018495 (3/8/2011)	730	731

**TABELA 34: IDENTIDADE DE PORCENTAGEM DO HOMÓLOGO YMR226C**

Espécie	Sm	Sb	Sca	Ag	Dh	Ss	Mg	Cd	Cg	Vp	Sk	Kl	Lt	Zr	Sce	Sp	Yl	N
Spa	88	82	70	64	62	62	58	57	67	68	68	69	68	68	90	55	55	5
Sm		82	70	64	60	62	58	56	67	69	68	70	68	69	86	57	56	5
Sb			71	63	59	62	58	53	67	66	68	70	69	67	82	56	56	5
Sca				60	62	61	60	59	65	69	69	71	64	70	69	57	53	5
Ag					56	60	57	54	59	61	62	62	62	62	63	54	55	5
Dh						64	62	61	61	63	62	61	59	63	62	57	57	5
Ss							68	64	61	62	62	64	62	63	62	56	58	5
Mg								60	57	58	60	60	59	62	59	57	57	5
Cd									57	62	59	60	54	60	58	57	53	4
Cg										69	70	68	67	67	66	55	56	5
Vp											71	72	67	70	71	58	52	5
Sk												77	71	72	69	53	54	5
Kl													71	72	71	56	52	5
Lt														69	69	53	60	5



Espécie	Sm	Sb	Sca	Ag	Dh	Ss	Mg	Cd	Cg	Vp	Sk	Kl	Lt	Zr	Sce	Sp	Yl	N
Spa	88	82	70	64	62	62	58	57	67	68	68	69	68	68	90	55	55	5
Zr															69	58	55	5
Sce																55	55	5
Spo																	58	6
Yl																		6
Nc																		

[0552] Tabela 34 Chave: *Saccharomyces paradoxus* ("Spa"); *Saccharomyces mikatae* ("Sm"); *Saccharomyces bayanus* ("Sb"); *Saccharomyces castellii* ("Sca"); *Ashbya gossypii* ("Ag"); *Debaryomyces hansenii* ("Dh"); *Scheffersomyces stipitis* ("Ss"); *Meyerozyma guilliermondii* ("Mg"); *Candida dubliniensis* ("Cd"); *Candida glabrata* ("Cg"); *Vanderwaltozyma polyspora* ("Vp"); *Saccharomyces kluyveri* ("Sk"); *Kluyveromyces lactis* ("Kl"); *Lachancea thermotolerans* ("Lt"); *Zygosaccharomyces rouxii* ("Zr"); *Saccharomyces cerevisiae* ("Sce"); *Schizosaccharomyces pombe* ("Spo"); *Yarrowia lipolytica* ("Yl"); *Neurospora crassa* ("Nc")

### **EXEMPLO 32 (TEÓRICO)**

#### **A TRIAGEM DE ALDEÍDOS DESIDROGENASES DE *S. CEREVISIAE* PARA A HABILIDADE DE CONVERTER ISOBUTIRALDEÍDO EM ÁCIDO ISOBUTÍRICO COM USO DE ENSAIOS**

##### **ENZIMÁTICOS**

[0553] Esse exemplo demonstra um método para determinar quais 15 aldeídos desidrogenases endógenas de *S. cerevisiae* podem converter de modo enzimático isobutiraldeído em ácido isobutírico.

[0554] Cepas de *S. cerevisiae* que contêm interrupções individuais nas enzimas de aldeído desidrogenase conhecidas são obtidas a partir de ATCC: BY4741  $\Delta ald2::kanMX4$  (ATCC #4000753); BY4741  $\Delta ald3::kanMX4$  (ATCC 20 #4000752); BY4741  $\Delta ald4::kanMX4$  (ATCC #4001671); BY4741  $\Delta ald5::kanMX4$  (ATCC #4000213); e BY4741  $\Delta ald6::kanMX4$  (ATCC #4002767).

[0555] As cepas de deleção acima são primeiramente cultivadas de um dia para o outro em tubos que contém 5 ml de meios com YPD em 30 °C. As

culturas de um dia para o outro de 5 ml são transferidas para 100 ml de meio em um frasco de 500 ml e encubados em 30 °C, agitando a 220 rpm. As culturas são colhidas quando as mesmas alcançam chegam de 1 a 2 de O.D. em 600 nm. As amostras são lavadas com 10 ml de Tris (pH 7,5) 20 mM e então são ressuspensas em 1 ml do mesmo tampão Tris. As amostras são transferidas para tubos de 2,0 ml que contém 0,1 mm de sílica (Lysing 30 Matrix B, MP biomedical). As células são quebradas, então, em um batedor de esferas (BIO101). O sobrenadante é obtido por centrifugação em uma microcentrífuga a 13.000 rpm em 4 °C por 30 minutos. Tipicamente, 0,06 a 0,1 mg de proteína de extrato bruto é utilizada em um único ensaio. A proteína nos extratos brutos foi determinada pelo ensaio Bradford com coloração de Coomassie.

[0556] A atividade de aldeído desidrogenase é medida seguindo um protocolo proporcionado por Sigma-Aldrich e por Bostian e Betts (Bostian, K.Um. e Betts, G.F. (1978) *Biochemical Journal* 173, 773 a 786). Os extratos brutos das cepas de deleção acima e da aldeído desidrogenase comercialmente disponível são testados com uso desse método.

[0557] Um ensaio alternativo é adicionar isobutiraldeído em concentrações de 1 a 30 mM em aproximadamente 0,1 mg de proteína de extrato bruto em recipientes de GC de vidro vedados que são encubados em 30 °C por 30 minutos. Os extratos são centrifugados, então, através de filtros spin de 0,22 µm (Corning, Cat #8169) a 3.000 rpm por 3 minutos e o filtrado é transferido para um recipiente de GC para análise por GC-MS. Isobutiraldeído e ácido isobutírico são detectados.

[0558] O método GC utiliza um Agilent 7890 GC equipado com um espectrômetro de massa 5975 para detecção e uma coluna do tipo DB-1701 (ID 30 m x 0,25 mm, película de 0,25 µm) de Agilent (Santa Clara, CA). O gás carreador é hélio em uma taxa de fluxo constante de 1.0 ml/min; a divisão de injetor é 1 : 10 em 250 °C; a temperatura de forno é 40 °C por 1 min, 40 °C a

120 °C em 10 °C/min, e 120 °C a 240 °C e 30 °C/min. A detecção de MS é utilizada em modo de varredura total para identificação e quantificação de isobutiraldeído e ácido isobutírico. Curvas padrões calibradas são geradas para os seguintes compostos: isobutiraldeído, ácido isobutírico e isobutanol.

### **EXEMPLO 33**

#### **CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO PARA EXPRESSÃO DE GENE DE VIA DE**

#### **ISOBUTANOL EM *S. CEREVISIAE***

#### **CONSTRUÇÃO DE PLH475-JEA1**

[0559] O plasmídeo pLH475-JEA1 (SEQ ID NO: 419) foi construído para expressão de ALS e KARI em levedura. pLH475-JEA1 é um vetor pHR81 (ATCC #87541) que contém os seguintes genes quiméricos: 1) o promotor CUP1 (SEQ ID NO: 789), região de codificação de acetolactato sintase a partir de *Bacillus subtilis* (AlsS; SEQ ID NO: 790; SEQ ID NO de proteína: 791) e terminador 2 CYC1 (SEQ ID NO: 792); 2) um promotor ILV5 (SEQ ID NO: 793), região de codificação de Pf5.IlvC-JEA1 e terminador ILV5 (SEQ ID NO: 794); e 3) o promotor FBA1 (SEQ ID NO: 795), região de codificação de *S. cerevisiae* KARI (ILV5; SEQ ID NO: 796; proteína SEQ ID NO: 797) e CYC1 terminador (SEQ ID NO: 798).

[0560] A região de codificação de Pf5.IlvC-JEA1 é uma KARI de codificação de sequência derivada de *Pseudomonas fluorescens*, contendo, porém, mutações, que foi descrita na Publicação de Pedido de Patente nºs US 2009/0163376 e US 2010/0197519, que estão integralmente incorporadas no presente documento a título de referência. A KARI codificada em Pf5.IlvC-JEA1 (ácido nucleico e aminoácido SEQ ID NOs: 799 e 800) tem as mudanças de aminoácido em comparação com a KARI de *Pseudomonas fluorescens* natural.

#### **VETOR DE EXPRESSÃO PLH468**

[0561] O plasmídeo pLH468 (SEQ ID NO: 139) foi construído para expressão de DHAD, KivD e HADH em levedura.

[0562] As regiões de codificação para cetoisovalerato descarboxilase (KivD) de *L. lactis* e álcool desidrogenase de fígado de cavalo (HADH) foram sintetizados por DNA2.0 com base em códons que foram otimizados para a expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NOs: 801 e 802, respectivamente) e fornecidos em plasmídeos pKivDy-DNA2.0 e pHadhy-DNA2.0. As proteínas codificadas são SEQ ID NOs: 803 e 804, respectivamente. Vetores de expressão individuais para KivD e HADH foram construídos. Para montar pLH467 (pRS426::P<sub>TDH3</sub>-kivDy-TDH3t), vetor pNY8; também chamado de pRS426.GPD-ald-GPDt, descrito na Publicação de Pedido de Patente US US2008/0182308, Exemplo 17, que é incorporada ao presente documento a título de referência) foi digerido com enzimas Ascl e Sfil, extirpando, assim, o promotor GPD e a região de codificação de ald. Um fragmento promotor *TDH3* (SEQ ID NO: 805) de pNY8 foi amplificado por PCR para adicionar um sítio de Ascl na terminação 5' e um sítio de SpeI na terminação 3', como uso de OT1068 iniciador 5' e OT1067 iniciador 3' (SEQ ID NOs: 806 e 807). O fragmento de vetor digerido por Ascl/Sfil foi ligado ao produto de PCR do promotor *TDH3* digerido com Ascl e SpeI e o fragmento de SpeI-Sfil que contém a região de codificação de kivD de códon otimizado isolada do vetor pKivD-DNA2.0. O vetor gerado por ligação tripla pLH467 (pRS426::PTDH3-kivDy-TDH3t). pLH467 (SEQ ID NO: 808) foi verificado por sequenciamento e mapeamento de restrição. pLH435 (pRS425::PGPM1-Hadhy-ADH1t) foi derivado do vetor pRS425::GPM-sadB (SEQ ID NO: 809) que é descrito na Publicação de Pedido nº US 2009/0305363, Exemplo 3, que é incorporado ao presente documento a título de referência. pRS425::GPM-sadB é o vetor pRS425 (ATCC #77106) com um gene quimérico que contém o promotor GPM1 (SEQ ID NO: 810), região de codificação de uma desidrogenase de butanol de *Achromobacter xylosoxidans* (sadB; DNA SEQ ID NO: 811 ; proteína SEQ ID NO: 812), e terminador ADH1 (SEQ ID NO: 444).

pRS425: :GPMp-sadB contém sítios de *BbvI* e *Pad* nas terminações 5' e 3' da região de codificação de sadB, respectivamente. Um sítio de *NheI* foi adicionado à terminação 5' da região de codificação de sadB por mutagênese direcionada por com uso dos Iniciadores OT1074 e OT1075 (SEQ ID NO. 813 e 814) para gerar o vetor pRS425-GPMp-sadB-NheI, que foi verificado por sequenciamento. O pRS425::P<sub>GPM1</sub>-sadB-NheI foi digerido com *NheI* e *Pad* para retirar a região de codificação de sadB e ligado ao fragmento *NheI*-*Pad* que contém a região de codificação HADH de códon otimizado do vetor pHadhy-DNA2.0 para criar pLH435 (SEQ ID NO: 815). Para combinar cassetes de expressão KivD e HADH em um único vetor, vetor de levedura pRS411 (ATCC # 87474) foi digerido com *Sad* e *NotI* e ligado ao fragmento *SacI*-*Sall* do pLH467 que contém o cassete P<sub>TDH3</sub>-*kivDy*-*TDH3t* junto com o fragmento *Sall*-*NotI* de pLH435 que contém o cassete P<sub>GPM1</sub>-*Hadhy*-*ADH1t* em uma reação de ligação tripla. Isso rendeu o vetor pRS411::P<sub>TDH3</sub>-*kivDy*-P<sub>GPM1</sub>-*Hadhy* (pLH441 , SEQ ID NO: 816), que foi verificado por mapeamento de restrição.

[0563] A fim de gerar um vetor de coexpressão para todos os genes na via de isobutanol inferior: *ilvD*, *kivDy* e *Hadhy*, utilizou-se pRS423 FBA *ilvD*(Strep) (SEQ ID NO: 817) como a fonte do gene *ilvD*. Esse vetor de transferência contém uma origem F1 de replicação (nt 1.423 a 1.879) para manutenção em *E. coli* e uma origem de 2 microns (nt 8.082 a 9.426) para replicação em levedura. O vetor tem um promotor FBA1 (nt 2.111 a 3.108; SEQ ID NO: 795) e terminador FBA1 (nt 4.861 a 5.860; SEQ ID NO: 818). Além disso, o mesmo carrega o marcador His (nt 504 a 1.163) para seleção em levedura e marcador resistente à ampicilina (nt 7.092 a 7.949) para seleção em *E. coli*. A região de codificação de *ilvD* (nt 3.116 a 4.828; SEQ ID NO: 819; proteína SEQ ID NO: 820) de UA159 de *Streptococcus mutans* (ATCC #700610) está entre o promotor FBA1 e o terminador FBA1 que formam um

gene quimérico para expressão. Além disso, há uma etiqueta de lumio unida à região de codificação de *ilvD* (nt 4.829 a 4.849).

[0564] A primeira etapa foi linearizar pRS423 FBA *ilvD*(Strep) (também chamado de pRS423-FBA(Spel)-*ilvD*(*Streptococcus mutans*)-Lumio) com *SacI* e *SacII* (com sítio de *SacII* com terminação cega com uso de DNA polimerase de T4) para proporcionar um vetor com comprimento total de 9.482 bp. A segunda etapa foi isolar o cassete *kivDy*-UADHy do pLH441 com *SacI* e *KpnI* (com sítio de *KpnI* com terminação cega com uso de DNA polimerase de T4) o que proporciona um fragmento de 6.063 bp. Esse fragmento foi ligado ao fragmento de vetor 9.482 bp de pRS423-FBA(Spel)-*ilvD*(*Streptococcus mutans*)-Lumio. Esse vetor pLH468 gerado (pRS423::P<sub>FBA1</sub>-*ilvD*(Strep)Lumio-FBA1t-P<sub>TDH3</sub>-*kivDy*-TDH3t-P<sub>GPM1</sub>-*hadhy-ADH1t*), que foi confirmado por sequenciamento e mapeamento de restrição.

### **EXEMPLO 34**

#### **CONSTRUÇÃO DE CEPA HOSPEDEIRA S. CEREVISIAE QUE CONTÉM MODIFICAÇÕES EM PIRUVATO DESCARBOXILASE E HEXOQUINASE 2**

[0565] Esse exemplo descreve inserção-inativação dos genes endógenos PDC1, PDC5 e PDC6 de *S. cerevisiae*. Os genes PDC1, PDC5 e PDC6 codificam as três maiores isoenzimas de piruvato descarboxilase. A Hexoquinase 2, que é responsável pela fosforilação de glicose e repressão transcricional, também é inativada. A cepa de inativação de PDC/HXK2 resultante foi utilizada como um hospedeiro para vetores de expressão pLH475-JEA1 e pLH468.

#### **CONSTRUÇÃO DE CASSETE DE INTEGRAÇÃO PDC6::P<sub>GPM1</sub>-SADB E DELEÇÃO DE PDC6**

[0566] Um cassete de integração *pdcc6::P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t-URA3r* foi feito ao unir o segmento *GPM-sadB-ADH1t* (SEQ ID NO: 821) de pRS425::*GPM-sadB* (descrito na Publicação de Pedido de Patente nº US 2009/0305363, incorporada a título de referência) ao gene *URA3r* de

pUC19-URA3r. O pUC19-URA3r (SEQ ID NO: 822) contém o marcador *URA3* de pRS426 (ATCC # 77107) dividido por sequências de repetição homóloga de 75 bp para permitir a recombinação homóloga *in vivo* e remoção do marcador *URA3*. Os dois segmentos de DNA foram unidos por SOE PCR (conforme descrito por Horton *et al.* (1989) *Gene* 77:61 a 68) usando como modelo DNAs de plasmídeo pRS425::*GPM-sadB* e pUC19-URA3r, com DNA polimerase da Phusion (New England Biolabs Inc., Beverly, MA; catálogo nº F-540S) e Iniciadores 114117-11A até 114117-1D (SEQ ID NOs: 823, 824, 825, 826), e 114117-13A e 114117-13B (SEQ ID NOs: 827 e 828).

[0567]Os Iniciadores externos para o SOE PCR (114117-13A e 114117-13B) continham regiões de ~50 bp de 5' e 3' às regiões a montante e a jusante do promotor e terminador PDC6, respectivamente. O fragmento de PCR de cassete completo foi transformado em BY4700 (ATCC # 200866) e transformantes foram mantidos nos meios completos sintéticos sem uracilo e suplementados com 2% de glicose em 30 °C com uso de tecnologias genéticas padrão (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201 a 202). Transformantes foram submetidos à triagem por PCR com uso dos Iniciadores 112590-34G e 112590-34H (SEQ ID NOs: 829 e 830) e 112590-34F e 112590-49E (SEQ ID NOs: 831 e 832) para verificar a integração no local de PDC6 com deleção da região de codificação de PDC6. O marcador *URA3r* foi reciclado por plaqueamento em meios completos sintéticos suplementados com 2% de glicose e 5-FOA em 30 °C seguindo protocolos padrões. A remoção de marcador foi confirmada ao remendar colônias das placas com 5-FOA em meios com SD-URA para verificar a ausência de cultivo. A cepa identificada resultante tem o genótipo: BY4700 *pdcc6::P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t*.

### **CONSTRUÇÃO DE CASSETE DE INTEGRAÇÃO DE *PDC1::P<sub>PDC1</sub>-ILVD* E DELEÇÃO DE *PDC1***

[0568] Um cassete de integração *pd<sub>1</sub>::P<sub>PDC1</sub>-ilvD-FBA1t-URA3r* (SEQ ID NO: 833) foi feito ao unir o segmento *ilvD-FBA1t* de pLH468 ao gene *URA3r* de pUC19-URA3r por SOE PCR (conforme descrito em Horton *et al.* (1989) *Gene* 77:61 a 68) com uso de um modelo de DNAs plasmídeo pLH468 e pUC19-URA3r DNAs, com DNA polimerase da Phusion (New England Biolabs Inc., Beverly, MA; catálogo nº F-540S) e Iniciadores 114117-27A até 114117-27D (SEQ ID NOs: 823, 824, 825, 826).

[0569] Os Iniciadores externos para o SOE PCR (114117-27A e 114117-27D) continham regiões de ~50 bp de 5' e 3' ~50 homólogas às regiões a jusante do promotor *PDC1* e a jusante da sequência de codificação *PDC1*. O fragmento PCR de cassete completo foi transformado em BY4700 *pd<sub>6</sub>::P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t* e transformantes foram mantidos nos meios completos sintéticos sem uracilo e suplementados com 2% de glicose em 30 °C com uso de tecnologias genéticas padrões (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201 a 202). Os transformantes foram submetidos à triagem por PCR com uso de Iniciadores 114117-36D e 135 (SEQ ID NOs 834 e 835) e Iniciadores 112590-49E e 112590-30F (SEQ ID NOs 832 e 836) para verificar a integração no local de *PDC1* com deleção da sequência de codificação de *PDC1*. O marcador *URA3r* foi reciclado por plaqueamento nos meios completos sintéticos suplementados com 2% de glicose e 5-FOA em 30 °C seguindo protocolos padrões. A remoção do marcador foi confirmada ao remendar as colônias das placas com 5-FOA em meios com SD-URA para verificar a ausência de cultivo. A cepa "NYLA67" identificada resultante tem o genótipo: BY4700 *pd<sub>6</sub>:: P<sub>GPM1</sub>sadB-ADH1t pd<sub>1</sub>:: P<sub>PDC1</sub>-ilvD-FBa1t*



### **DELEÇÃO DE HIS3**

[0570] Para deletar a região de codificação de HIS3 endógena, um cassete de *his3::URA3r2* foi amplificado por PCR a partir do DNA de modelo URA3r2 (SEQ ID NO: 837). URA3r2 contém o marcador URA3 de pRS426 (ATCC # 77107) dividido por sequências de repetição homólogas de 500 bp para permitir a recombinação homóloga *in vivo* e remoção do marcador URA3. O PCR foi feito com uso de DNA polimerase da Phusion e Iniciadores 114117-45A e 114117-45B (SEQ ID NOs: 838 e 839) que gerou um produto de PCR de ~2,3 kb. A porção de HIS3 de cada iniciador foi derivada da região 5' a montante do promotor HIS3 e da região 3' a jusante da região de codificação de modo que a integração do marcador URA3r2 resulte na substituição da região de codificação de HIS3. O produto de PCR foi transformado em NYLA67 com uso de tecnologias genéticas padrões com uso de tecnologias genéticas padrões (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201 a 202) e transformantes foram selecionados em meios completos sintéticos sem uracilo e suplementados com 2% de glicose em 30 °C. Os transformantes foram submetidos à triagem para verificar a integração correta por plaqueamento de réplica de transformantes em meios completos sintéticos sem histidina e suplementados com 2% de glicose em 30 °C. O marcador URA3r foi reciclado por plaqueamento em meios completos sintéticos suplementados com 2% de glicose e 5-FOA em 30 °C seguindo protocolos padrões. A remoção de marcador foi confirmada ao remendar colônias de placas com 5-FOA em meios com SD-URA para verificar a ausência de cultivo. A cepa identificada resultante, denominada de NYLA73, tem o genótipo: BY4700 *pdcc6::P<sub>GPM1</sub>sadB-ADH1t pdc1::P<sub>PDC1</sub>ilvD-FBa1t*

### **DELEÇÃO DE HXK2**

[0571] Um cassete de *hvk2::URA3r* foi amplificado por PCR a partir do modelo URA3r2 (descrito acima) com uso de DNA polimerase da

Phusion e Iniciadores 384 e 385 (SEQ ID NOs: 840 e 841 ) que gerou um produto de PCR de ~2,3 kb. A porção de HXK2 de cada iniciador foi derivada da região 5' a montante do promotor HXK2 e da região 3' a jusante da região de codificação de modo que a integração do marcador URA3x2 resulte na substituição da região de codificação de HXK2. O produto de PCR foi transformado em NYLA73 com uso de tecnologias genéticas padrões (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201 a 202) e transformantes foram selecionados em meios completos sintéticos sem uracilo e suplementados com 2% de glicose em 30 °C. Os transformantes foram submetidos à triagem por PCR para verificar a integração correta no local de HXK2 com a substituição da região de codificação de HXK2 com uso dos Iniciadores N869 e N871 (SEQ ID NOs: 842 e 843). O marcador URA3r2 foi substituído por plaqueamento em meios completos sintéticos suplementados com 2% de glicose e 5-FOA em 30 °C seguindo protocolos padrões. A remoção de marcador foi confirmada ao remendar colônias de placas com 5-FOA em meios com SD-URA para verificar a ausência de cultivo e por PCR para verificar a remoção de marcador correta com uso dos Iniciadores N946 e N947 (SEQ ID NOs: 844 and 845). A cepa identificada resultante denominada NYLA83 tem o genótipo: BY4700 *pdv6::P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t pdv1::P<sub>PDC1</sub>-ilvD-FBA1t Δhis3 Δhvk2*.

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

[0572] Um cassete de *pdv5::kanMX4* foi amplificado por PCR a partir do DNA cromossomal YLR134W de cepa (ATCC nº 4034091) com uso de DNA polimerase da Phusion e Iniciadores PDC5: :KanMXF e PDC5::KanMXR (SEQ ID NOs: 846 e 847) que gerou produto de PCR de ~2,2 kb. A porção de *PDC5* de cada iniciador foi derivada da região 5' a montante do promotor *PDC5* e da região 3' a jusante da região de codificação de modo que a integração do marcador kanMX4 resulte na substituição da região de codificação de *PDC5*. O

produto de PCR foi transformado em NYLA83 e transformantes foram selecionados conforme descrito acima. Os transformantes corretos identificados denominados NYLA84 têm o genótipo: BY4700 *pdv6::P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t pdv1::P<sub>PDC1</sub>-ilvD-FBA1t Δhis3 Δhvk2 pdv5::kanMX4*. Os vetores de plasmídeo pLH468 e pLH475-JEA1 foram simultaneamente transformados em cepa NYLA84 (BY4700 *pdv6::P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t pdv1::P<sub>PDC1</sub>-ilvD-FBA1t pdv1::P<sub>PDC1</sub>-ilvD-FBA1t Δhis3 Δhvk2 pdv5::kanMX4*) com uso de tecnologias genéticas padrões (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e a cepa resultante foi mantida em meios completos sintéticos sem histidina e uracilo e suplementados com 1 % de etanol em 30 °C.

### **EXEMPLO 35 (TEÓRICO)**

#### **CONSTRUÇÃO DE CEPA HOSPEDEIRA S. CEREVISIAE QUE CONTÉM MODIFICAÇÕES EM PIRUVATO DESCARBOXILASE, HEXOQUINASE 2 E ALDEÍDO DESIDROGENASE**

[0573] Esse exemplo descreve a inativação de uma ou mais aldeídos desidrogenases para abolir ou reduzir a formação de ácido isobutírico. A interrupção de ALD2 é utilizada como um exemplo, porém o método pode ser utilizado para a interrupção de qualquer aldeído desidrogenase. A cepa derivada de NYLA84 resultante é utilizada como um hospedeiro para vetores de expressão pLH475-JEA1 e pLH468.

#### **DELEÇÃO DE ALD2**

[0574] Um cassete de *ald2::URA3r* é amplificado por PCR a partir de modelo de URA3r2 (descrito acima) com uso de DNA polimerase da Phusion e Iniciadores T001 e T002 (SEQ ID NOs: 848 e 849) que gera um produto de PCR de ~2,3 kb. A porção de *ALD2* de cada iniciador é derivada da sequência 5' e da sequência 3' do gene *ALD2* de modo que a integração do marcador URA3r2 resulte na substituição da região de codificação *ALD2*. O produto de PCR é transformado em NYLA84 com uso de tecnologias genéticas

padrões (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201 a 202) e transformantes são selecionados em meios completos sintéticos sem uracilo e suplementados com 1 % etanol em 30 °C. Transformantes são submetidos à triagem por PCR para verificar a integração correta no local de *ALD2* em que a substituição da região de codificação *ALD2* utiliza os Iniciadores T003 e T004 (SEQ ID NOs: 850 e 851). O marcador *URA3r2* é reciclado por plaqueamento em meios completos sintéticos suplementados com 1% de etanol e 5-FOA em 30 °C seguindo protocolos padrões. A remoção de marcador é confirmada ao remendar colônias de placas com 5-FOA em meios com SE-URA para verificar a ausência de cultivo e por PCR para verificar a remoção de marcador correta com uso dos Iniciadores T004 e T005 (SEQ ID NOs: 851 e 852). A cepa identificada resultante é denominada NYLA84 *Aald2* e é do genótipo: BY4700 *pdcc6:: P<sub>GPM1</sub>-sadB-ADH1t pdc1:: P<sub>PDC1</sub>-ilvD-FBA t Δhis3 Δhxxk2 Δald2*.

### **EXEMPLO 36**

#### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL EM *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE EM NYLA84**

##### **MÉTODO HPLC**

[0575] Análise para glicose e composição de subproduto de fermentação é bem conhecida por aqueles versados na técnica. Por exemplo, um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utiliza uma coluna do tipo Shodex SH-1011 com uma pré-coluna do tipo Shodex SH-G (ambas disponíveis por Waters Corporation, Milford, MA), com detecção de índice refrativo (RI). A separação cromatográfica é alcançada com uso de 0,01 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como a fase móvel com uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min e uma temperatura de coluna de 50 °C. O tempo de retenção de isobutanol é 47,6 minutos.

#### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL EM *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE EM NYLA84**

[0576] A finalidade desse exemplo é descrever a produção de isobutanol na cepa de levedura NYLA84. A cepa de levedura compreende deleções

de PDC1 , PDC5, e PDC6, três isoenzimas de piruvato descarboxilase de codificação de genes e deleção de Hexoquinase 2 de codificação de HXK2. A cepa também contém construtos para expressão heteróloga de AlsS (acetolactato sintase), KARI (ceto ácido reductoisomerase), DHAD (diidróxi ácido desidratase), KivD (cetoisovalerato decarboxilase), SadB (álcool desidrogenase secundária) e HADH (álcool desidrogenase de fígado de cavalo).

### **CONSTRUÇÃO DE CEPA**

[0577] Os plasmídeos pLH468 e pLH475-JEA1 foram introduzidos em NYLA84, por métodos de transformação mediados por acetato de lítio/PEG. Os transformantes foram selecionados em meio completo sintético sem glicose, histidina e uracilo. Etanol (1 % em v/v) foi utilizado como a fonte de carbono. Após três dias, os transformantes foram remendados em meio completo sintético sem histidina e uracilo suplementado tanto com 2% de glicose quanto com 0,5% de etanol como fontes de carbono. Recipientes de congelador foram feitos para diluição de culturas de fase log com 45% de glicerol para uma concentração final de glicerol de 15% (em p/v).

### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL**

[0578] Os recipientes de congelador foram utilizados para inocular 80 ml de meio completo sintético sem histidina e uracilo suplementado tanto com 2% de glicose quanto com 0,5% de etanol como fontes de carbono.

Condições de fermentação:

[0579] Um 1 litro de agente de fermentação foi preparado e esterilizado com 0,4 l de água. Após resfriamento, meio esterilizado com filtro foi adicionado para proporcionar as concentrações finais seguintes em 800 ml de pós-inoculação:

Meio (concentração final):

6,7 g/l de Base de Nitrogênio de Levedura sem aminoácidos (Difco)

2,8 de g/l, Suplemento de Meio de Retirada Sintético de Levedura sem Histidina, Leucina, Triptófano e Uracilo (Sigma Y2001)

20 ml/l de 1 % (em p/v) de L-Leucina

4 ml/l de 1 % (em p/v) de L-Triptófano

1 ml/l de ergosterol/tween/solução de etanol

0,2 ml/l de DF204 da Sigma

10 g/l de glicose

[0580] O agente de fermentação foi ajustado para controlar em pH de 5,5 com KOH, 30% de dO, temperatura 30 °C e fluxo de ar de 0,2 SLPM (ou 0,25 vvm). Na inoculação, o fluxo de ar foi ajustado a 0,01 SLPM inicialmente, então aumentado para 0,2 SLPM uma vez que o cultivo foi estabelecido. A glicose foi mantida em 5 a 15 g/l do começo ao fim por adição manual.

[0581] O ar foi continuamente suprido ao fermentador em 0,25 vvm. A aeração contínua levou a um esgotamento significativo de isobutanol da fase aquosa do fermentador. Para quantificar a perda de isobutanol devido ao esgotamento, o efluente gasoso do fermentador foi diretamente enviado para um espectrômetro de massa (Espectrômetro de massa da Prima dB, Thermo Electron Corp., Madison, WI) para quantificar a quantidade de isobutanol na corrente de gás. Os picos de isobutanol em massa para carregar relações de 74 ou 42 foram monitorados continuamente para quantificar a quantidade de isobutanol na corrente de gás. A glicose e os ácidos orgânicos na fase aquosa foram monitorados durante a fermentação com uso de HPLC. A glicose também foi monitorada rapidamente com uso de um analisador de glicose (YSI, Inc., Yellow Springs, OH). O isobutanol na fase aquosa foi quantificado por HPLC conforme descrito no método HPLC no presente documento acima após a fase aquosa ser removida periodicamente do fermentador. A titulação eficaz, corrigida para a perda de isobutanol devido ao esgotamento, foi 7,5 g/l. A titulação de ácido isobutírico foi 1,28 g/l (Figura 14).

### **EXEMPLO 37 (TEÓRICO)**

#### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL EM *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE EM NYLA84 $\Delta$ ALD2**

[0582] A finalidade desse exemplo é descrever a produção de isobutanol na cepa de levedura NYLA84. A interrupção de *ALD2* é utilizada como exemplo, porém o exemplo pode ser utilizado para interrupção de qualquer aldeído desidrogenase. A cepa de levedura NYLA84  $\Delta$ *ald2* compreende deleções de PDC1, PDC5 e PDC6, três isoenzimas de piruvato descarboxilase de codificação de genes, deleção de Hexoquinase 2 de codificação de HXK2 e deleção de aldeído desidrogenase de codificação de *ALD2*. A cepa também contém construtos para expressão heteróloga de AlsS (acetolactato sintase), KARI (ceto ácido reductoisomerase), DHAD (diidróxi ácido desidratase), KivD (cetoisovalerato decarboxilase) e SadB (álcool desidrogenase secundária).

#### **CONSTRUÇÃO DE CEPA**

[0583] Os plasmídeos pLH468 e pl\_H475-JEA1 são introduzidos em NYLA84  $\Delta$ *ald2*, por métodos de transformação mediados por acetato de lítio/PEG. Os transformantes são selecionados no meio completo sintético sem glicose, histidina e uracilo. O etanol (1 % v/v) é utilizado como a fonte de carbono. Após três dias, os transformantes são remendados em meio completo sintético sem histidina e uracilo suplementado tanto com 2% glicose quanto com 0,5% de etanol como fontes de carbono. Os recipientes de congelador são feitos por diluição de culturas de fase log com 45% de glicerol para uma concentração final de glicerol de 15% (em p/v).

#### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL**

[0584] Os recipientes de congelador são utilizados para inocular 80 ml de meio completo sintético sem histidina e uracilo suplementado tanto com 0,25% de glicose quanto com 0,5% de etanol como fontes de carbono. Um 1 litro de agente de fermentação é preparado e esterilizado com 0,4 l de água.

após o resfriamento, o meio esterilizado com filtro é adicionado para proporcionar as concentrações finais seguintes em 800 ml. Pós-inoculação:

Meio (concentração final):

6,7 g/l de Base de Nitrogênio de Levedura sem aminoácidos (Difco)

2,8 g/l de Suplemento de Meio de Retirada Sintético de Levedura sem Histidina, Leucina, Triptófano e Uracilo (Sigma Y2001 )

20 ml/l de 1% (em p/v) de L-Leucina.

4 ml/l de 1% (em p/v) de L- Triptófano

1 ml/l de ergosterol/tween/solução de etanol

0,2 ml/l de DF204 da Sigma

10 g/l de glicose

[0585] O agente de fermentação é ajustado para controlar em pH 5,5 com KOH, 30% de dO, temperatura 30 °C e fluxo de ar de 0,2 SLPM (ou 0,25 vvm). Na inoculação, o fluxo de ar é ajustado a 0,01 SLPM inicialmente, então aumentado para 0,2 SLPM uma vez que o cultivo é estabelecido. A glicose é mantida em 5 a 15 g/l do começo ao fim por adição manual.

[0586] A quantidade de perda de isobutanol devido ao esgotamento, o efluente gasoso do fermentador é diretamente enviado para um espectrômetro de massa (Espectrômetro de massa da Prima dB, Thermo Electron Corp., Madison, WI) para quantificar a quantidade de isobutanol na corrente de gás. Os picos de isobutanol na massa para carregar relações de 74 ou 42 são monitorados continuamente para quantificar a quantidade de isobutanol na corrente de gás. A glicose e os ácidos orgânicos na fase aquosa são monitorados durante a fermentação com uso de HPLC. A glicose é também monitorada rapidamente com uso de um analisador de glicose (YSI, Inc., Yellow Springs, OH). O isobutanol e o ácido isobutírico na fase aquosa



são quantificados por HPLC após a fase aquosa ser removida periodicamente do fermentador.

### **EXEMPLO 38**

#### **ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ISOBUTÍRICO**

[0587] As cepas foram inoculadas no meio completo sintético, menos histidina e uracilo, suplementado com 0,05% de etanol. Uma vez que as culturas tenham alcançado um estado estacionário, as mesmas foram submetidas a subcultura em meio fresco (OD inicial = 0,2). Para PNY2205 (Exemplo 13), o meio foi suplementado com 0,05% etanol para satisfazer a exigência C2 observada em leveduras PDC KO que não têm a via de fosfocetolase. Para PNY2209 (Exemplo 13), as células foram submetidas à subcultura em meios sem etanol. Para os clones ald6Δ (PNY2216 e clones isogênicos, Exemplo 24), um meio sem etanol foi utilizado. As culturas foram cultivadas em frascos de agitação com tampa de atarraxar (20 ml de meio em frascos de 125 ml). Os sobrenadantes da cultura foram coletados imediatamente após a inoculação e novamente após 48 horas. Esses sobrenadantes da cultura foram analisados por HPLC (descrito em US20070092957, incorporado ao presente documento a título de referência) para determinar o consumo de glicose e a concentração de ácido isobutírico.

**TABELA 35. RENDIMENTO MOLAR DE ÁCIDO ISOBUTÍRICO EM CEPAS DE ALD6A.**

Cepa	Rendimento molar de ácido isobutírico (mol/mol de glicose consumido)
PNY2205*	0,09
PNY2209*	0,07
PNY2209	0,09
PNY2216 e 5 outros clones isogênicos	0,03

\* Indica que o meio de cultura foi suplementado com etanol a 0,05%

**EXEMPLO 39****PRODUÇÃO AUMENTADA DE ISOBUTANOL E PRODUÇÃO DE SUBPRODUTO****DIMINUÍDA EM CEPAS NOVAS**

[0588]O propósito desse exemplo é descrever experimentos de cultivo de escala pequena com as cepas recentemente construídas com o uso do plasmídeo pK9G9.OLE1 p.ilvD para suprir os genes de via de isobutanol restantes. As novas cepas hospedeiras PNY1528, PNY2243, PNY2237 e PNY2238 foram transformadas com o plasmídeo pK9G9.OLE1 p.ilvD e testadas para a produção de isobutanol. Os transformantes foram obtidos pela seleção no meio completo sintético sem uracila com etanol a 1% como a fonte de carbono. Os transformantes foram remendados no meio completo sintético sem uracila com glicose a 2% e etanol a 0,05% como fontes de carbono. Remendos foram usados para inocular o meio líquido (meio completo sintético sem uracila com glicose a 0,3% e etanol a 0,3% como fontes de carbono). Para testar a produção de isobutanol, as culturas líquidas foram subcultivadas no meio completo sintético sem uracila que contém glicose a 2% e etanol a 0,05% como fontes de carbono que também continham mistura de vitamina BME (Sigma Cat.nºB6891). As culturas foram incubadas em recipientes de soro vedados (10 ml do meio em recipientes de 15 ml) a 30°C com agitação (250 rpm em um agitador Infors Multitron). Após 48 horas, o meio de cultura foi filtrado (coluna Spin-X) e analisado por HPLC (conforme descrito anteriormente na Publicação de PatentenºUS20070092957). O rendimento molar do isobutirato de subproduto de via foi diminuído por 50% em cepas que carregam o ald6A. Revelou-se que as cepas com base em PNY2238 têm maior consumo de glicose e titulação de isobutanol (resultados de clone K mostrados na tabela abaixo).

**TABELA 36. RENDIMENTO MOLAR DE ÁCIDO ISOBUTÍRICO NAS CEPAS DE ALD6A**

Cepa	Fenótipo relevante	Rendimento molar de ácido isobutírico (mol/mol de glicose consumido)
PNY2205*	ALD6+, dependente de C2	0,09
PNY2209*	ALD6+, independente de C2	0,07
PNY2209	ALD6+, independente de C2	0,09
PNY2216 e 5 outros clones isogênicos	ALD6-, independente de C2	0,03

\* indica que o meio de cultura foi suplementado com etanol a 0,05%. Todas as cepas continham o plasmídeo pK9G9.OLE1 p.ilvD. Para as cepas derivadas de PNY2237 e PNY2238, os dados apresentados são uma média de duas réplicas biológicas.

#### **EXEMPLO 40**

##### **CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE GENE DE SATURAÇÃO EM SÍTIO E TRIAGEM**

##### **DA PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL DAS VARIANTES RESULTANTES EM PNY2259**

[0589] A mistura de iniciador inverso (chamada de K9\_309r nesse exemplo) que contém Iniciadores que codificam todas as 20 alterações de aminoácido individuais na posição 309 (Tabela 37) e o iniciador direto K9\_131T\_08021 1f:GGACTTGATGTCACTATGATC (chamado de K9\_131 Tf nesse exemplo) foram empregados para criar uma biblioteca de saturação de sítio único que direciona a posição de 309 de K9 KARI. Um plasmídeo que contém a variante K9SB2 (pHR81 - ILV5p.K9SB2.TEF1 (M4)p.ilvD (SEQ ID NO: 930, também chamada de "pLH744").

[0590] Em resumo, um megainiciador foi preparado através de uma PCR regular. A mistura de PCR de megainiciador consistia em 45 µl de SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, n<sup>o</sup>10572063), 2,0 µl de K9\_131Tf (20 µM), 2,0 µl de K9\_309r (20 µM) e 1,0 µl de modelo (50 mg/µl). O programa de PCR para fazer o megainiciador é: a temperatura inicial foi 95°C por 1,0 minuto seguida por 35 ciclos de aquecimento/resfriamento. Cada ciclo consistia em 95°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 1,0 minuto. O megainiciador foi, então, usado para introduzir a mutação em K9SB2 com o

uso do mesmo procedimento conforme mostrado no Exemplo 5. Os clones da biblioteca de saturação de sítio único foram sequenciados.

[0591] As variantes exclusivas resultantes juntamente com o pLH744 foram analisadas para a produção de isobutanol e formação de subproduto na levedura (tripla para cada mutante). As cepas de via de levedura foram feitas no hospedeiro PNY2259 (MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t- P[FBA1]-ALS|alsS\_Bs-CYC1t pdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB\_Ax-PDC5t gpd2Δ::loxP fra2Δ::P[PDC1]-ADH|adh\_HI-ADH1t adh1Δ::UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_Lg(y)-ADH1t yprcΔ15Δ::P[PDC5]-ADH|adh\_HI-ADH1t ymr226cΔ ald6Δ::loxP; Exemplo 22) pela transformação dos vetores de KARI. As células transformadas foram plaqueadas no meio sintético sem histidina ou uracila (etanol a 1% como a fonte de carbono). Três transformantes foram transferidos para placas novas do mesmo meio. Os transformantes foram testados para a produção de isobutanol sob condições anaeróbicas em placas de 48 cavidades (Axygen, Union City, CA nº 391 -05- 061).

[0592] As colônias de levedura da transformação nas placas de SE-Ura apareceram após 5 a 7 dias. As três colônias de cada variante foram remendadas em placas de SE-Ura novas e incubadas a 30 °C por 3 dias.

### **PROCEDIMENTO E MEIO DE CULTIVO**

[0593] Dois tipos de meio foram usados durante o procedimento de cultivo das cepas de levedura: um meio de pré-cultura aeróbico e um meio de cultura anaeróbico. Todos os produtos químicos foram obtidos junto à Sigma a não ser que notado de outra maneira (St. Louis, MO).

[0594] Meio de pré-cultura aeróbico (SE-Ura): 6,7 g/l de base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos (Difco, 291940, Sparks, MD), 1,4 g/l de suplemento de meio de retirada sintética de levedura sem histidina, leucina,

triptofano e uracila, etanol a 0,2%, glicose a 0,2%, 0,01% em p/v de leucina, 0,002% em p/v de histidina e 0,002% em p/v de triptofano.

[0595] Meio de cultura anaeróbico (SEG-Ura-His): MES a 50 mM (pH 5,5, 6,7 g/l de base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos (Difco, 291940, Sparks, MD), 1,4 g/l de suplemento de meio de retirada sintética de levedura sem histidina, leucina, triptofano e uracila, etanol a 0,1%, glicose a 3%, leucina a 0,01%, 0,002% em p/v de histidina, triptofano a 0,002%, 30 mg/l de ácido nicotínico, 30 mg/l de tiamina e 10 mg/l de ergosterol feito em 50/50 em v/v de solução de Tween/etanol.

[0596] As células remendadas foram inoculadas em placas de 48 cavidades. Cada poço contém 1,5 ml de meio aeróbico. As placas foram cobertas com folhas permeáveis e cultivadas a 30°C com agitação de um dia para o outro. A densidade celular ( $OD_{600}$ ) foi, então, medida. A quantidade de células para fazer 1,5 ml da suspensão de células (no meio anaeróbico) com a  $OD_{600}$  final = 0,2 para cada poço foi calculada e 1,5 ml da suspensão de células foi preparado com o meio anaeróbico e adicionado a cada poço. O oxigênio em placas de 48 cavidades foi removido com o uso de uma câmara anaeróbica seguindo o protocolo do fabricante (Coy Laboratory Products Inc. Grass Lake, MI). As células foram, então, cultivadas a 30°C com agitação por dois dias. A densidade celular ( $OD_{600}$ ) foi, então, medida. Os melhores mutantes cultivados foram submetidos ao mesmo cultivo de dois dias nas placas de 48 cavidades para a medição de produção de isobutanol. Após o cultivo anaeróbico de dois dias, a densidade celular ( $OD_{600}$ ) foi, então, medida. As células foram centrifugadas em 4.000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado para a medição de isobutanol com o uso de LC/MS.

#### **ANÁLISE DE LC/MS DAS CEPAS DE LEVEDURA COM MUTANTES DE K9 KARI**

[0597] As amostras foram retiradas por análise LCMS no final do período de cultivo anaeróbico. A análise LCMS foi realizada com o uso de uma

unidade de separações Waters AcQuity UPLC e espectrômetro de massa triplo ou quádruplo AcQuity TQD (Waters, Milford, MA) com uma coluna de separações Waters AcQuity UPLC HSS T3 (Waters, Milford, MA). Os compostos foram separados com o uso de um gradiente de fase inversa de água (ácido fórmico a + 0,1%) e acetonitrilo (ácido fórmico a + 0,1%) iniciando com 99% aquoso e finalizando com 99% orgânico, a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. As cromatografias foram analisados com o uso do software Waters Masslynx 4.1 (Waters, Milford, MA). Os rendimentos micromolares para isobutanol foram calculados com o uso do software Waters Quanlynx (Waters, Milford, MA) com o uso de uma curva de calibração de análises triplicadas de padrões.

**TABELA 37. INICIADORES INVERSOS**

Posição(ões) direcionada(s) de K9-KARI	Iniciadores
309	K9_309I_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAATGTGGAC (SEQ ID NO: 884) K9_309L_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTAAGTGGAC (SEQ ID NO: 885) K9_309Y_111711r: CTTTCTCATAGCCTTATAGTGGAC (SEQ ID NO: 886) K9_309C_111711r: CTTTCTCATAGCCTTACAGTGGAC (SEQ ID NO: 887) K9_309W_111711r: CTTTCTCATAGCCTTCCAGTGGAC (SEQ ID NO: 888) K9_309P_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTGGGTGGAC (SEQ ID NO: 889) K9_309H_111711r: CTTTCTCATAGCCTTATGGTGGAC (SEQ ID NO: 890) K9_309Q_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTTGGTGGAC (SEQ ID NO: 891) K9_309M_111711r: CTTTCTCATAGCCTTCATGTGGAC (SEQ ID NO: 892) K9_309N_111711r: CTTTCTCATAGCCTTATTGTGGAC (SEQ ID NO: 893) K9_309V_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAACGTGGAC (SEQ ID NO: 894) K9_309A_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAGCGTGGAC (SEQ ID NO: 895) K9_309D_111711r: CTTTCTCATAGCCTTATCGTGGAC (SEQ ID NO: 896) K9_309E_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTTCGTGGAC (SEQ ID NO: 897) K9_309G_111711r: CTTTCTCATAGCCTTACCGTGGAC (SEQ ID NO: 898) K9_309S_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAGAGTGGAC (SEQ ID NO: 899) K9_309T_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAGTGTGGAC (SEQ ID NO: 900) K9_309R_111711r: CTTTCTCATAGCCTTCTGTGGAC (SEQ ID NO: 901) K9_309K_111711r: CTTTCTCATAGCCTTCTGTGGAC (SEQ ID NO: 902)

**TABELA 38. LISTA DE ALGUMAS VARIANTES COM OD<sub>600</sub> E TITULAÇÃO DE ISOBUTANOL**

**(mM) APÓS O CULTIVO ANAERÓBICO DE DOIS DIAS**

Variante	Aminoácido SEQ ID NO:	Repetição	OD <sub>600</sub>	Titulação de isobutanol (mM)
K9C4	927	1	0,5502	76,99
		2	0,6578	84,05
		3	0,7301	98,91
K9C8	928	1	0,6887	116,57

Variante	Aminoácido SEQ ID NO:	Repetição	OD <sub>600</sub>	Titulação de isobutanol (mM)
K9SB2	427	2	0,5309	78,77
		3	0,6859	102,49
		1	0,6314	88,39
		2	0,5977	81,18
		3	0,2325	44,60

### **EXEMPLO 41**

#### **CONSTRUÇÃO DE K9SB2 SH (K9SB2 SHORT), UMA VERSÃO TRUNCADA DE K9SB2**

[0598] Um gene que codifica uma versão de K9SB2 sem os primeiros cinco aminoácidos de N-terminal (MEECK) foi preparado por PCR com o Kit Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR (n<sup>o</sup> de Catálogo E0553L, New England Biolabs). Os Iniciadores Kshort1 (AAACCGGTTTAAACAGTATGGCTAAGATTTACTACCAAGAAGACTG; SEQ ID NO: 903) e YGrev (TTCTGTTTTATCAGACCGCTTC; SEQ ID NO. 904) foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville IA). Diferente dos Iniciadores, mistura de dNTP (Cat n<sup>o</sup> 18427-013, Invitrogen, Carlsbad, CA), modelo e ddH<sub>2</sub>O, os reagentes usados aqui foram supridos com o kit indicado acima. A mistura de PCR consistia em 1 µl de K9SB2 em um plasmídeo pBAD.KARI (20 mg/µl; a preparação de plasmídeo descrita no Exemplo 17; SEQ ID NO: 428), 2 µl de cada iniciador (20 µM de estoques), 10 µl do tampão 5<sup>x</sup> Phusion HF, 2 µl de mistura de dNTP a 5 mM, 0,5 µl de polimerase e 28 µl de ddH<sub>2</sub>O. As seguintes condições foram usadas para a reação de PCR: A temperatura inicial foi 98 °C por 2 minutos seguidos por 30 ciclos de aquecimento/resfriamento. Cada ciclo consistia em 98°C por 10 segundos, 48°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minuto. Na conclusão da ciclagem de temperatura, a amostra foi mantida a 72°C por mais 10 minutos e, então, retida aguardando a recuperação de amostra a 4 °C. O produto de reação foi separado do modelo por meio da eletroforese em gel de agarose (agarose a 1 %, tampão 1X TBE) e recuperado com o uso do Kit Illustra GFX<sup>™</sup> PCR DNA

e Gel Band Purification (Cat nº 28-9034-70, GE Healthcare Sciences, Piscataway, NJ) conforme recomendado pelo fabricante. O produto de PCR purificado foi digerido com PmeI e SfiI e ligado nos sítios correspondentes de pBAD-ps-JEA1 (SEQ ID NO: 905) e a sequência do construto resultante K9SB2\_SH em pBAD.KARI (SEQ ID NO: 929) foi confirmada.

#### **EXEMPLO 42**

#### **GERAÇÃO DE PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA PARA ESTUDOS DE K9SB2 E**

#### **OUTRAS ENZIMAS KARI**

#### **CONSTRUÇÃO DE pHR81-LLV5p-K9SB2-TEF(M4)-LLvD (pLH744: SEQ ID NO: 930)**

[0599] O gene K9SB2 foi extirpado de pHR81-ILV5p-K9SB2 pela digestão de PmeI e SfiI e ligado com pHR81-ILV5p-K9D3-TEF(M4)-llvD (pBP2090) nos sítios de PmeI e SfiI. O vetor ligado foi nomeado pHR81-ILV5p-K9SB2-TEF(M4)-llvD (pLH744) e esse vetor foi confirmado por sequenciamento.

#### **CONSTRUÇÃO DE K9SB2 SH DHAD (SEQ ID NO: 931)**

[0600] O produto de PCR K9SB2\_SH digerido (descrito no exemplo 41) foi ligado aos sítios PmeI e SfiI de pLH744 e confirmado por sequenciamento.

#### **CONSTRUÇÃO DE K9SB2 SH 81 (SEQ ID NO: 932)**

[0601] O produto de PCR K9SB2\_SH digerido (descrito no exemplo 41) foi ligado aos sítios PmeI e SfiI de pHR81-PIIv5-KARI-K9.G9 e confirmado por sequenciamento.

#### **CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA A EXPRESSÃO DE LEVEDURA DOS**

#### **DERIVADOS DE K9SB2**

[0602] Os plasmídeos de expressão de levedura para as variantes listadas na Tabela 39 (descritos nos exemplos 17 e 21) foram gerados pela subclonagem dos genes de KARI correspondentes dos plasmídeos pBAD.KARI



nos sítios de PmeI e SfiI do plasmídeo pLH744 e no plasmídeo pHR81-Pllv5-KARI-K9.G9. Os construtos foram confirmados por sequenciamento.

**TABELA 39: DERIVADOS DE K9SB2 SUBCLONADOS EM PLASMÍDEOS DE**

**EXPRESSÃO DE LEVEDURA**

Derivado de K9SB2	Nome alternativo	ID de sequência de Aminoácido	ID de sequência de ácido nucleico
K9SB2-K90M	K9_David	431	432
K9SB2-G55D	K9_Eliza	433	946
K9SB2-Q91L	K9_Frank	440	947
K9SB2-A303D	K9_Grace	445	948
K9SB2-M94-V307I	K9_Ingrid	455	949
K9SB2-F67I	K9_Jarvis	437	950
K9SB2-A56G-K90N	K9_Kelly	452	951
K9SB2-G55C	K9_Norman	481	952
K9SB2-P135S	K9_Ophelia	488	953
K9SB2-F53L	K9_Pat	441	954
K9SB2-Q94I	K9_Quentin	495	955
K9SB2-F67L	K9_Ralph	496	956
K9SB2-K8N-K90-T141I	K9_Sophia	502	957
K9SB2-E13V-M94I-T141I	K9_Tiberius	509	958
K9SB2-A56V	K9_Ursula	511	959
K9SB2-I84L	K9_Victor	514	960
K9SB2-W59C	K9_Watson	520	961
K9SB2-T93A	K9_Xavier	641	642

**CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA A EXPRESSÃO DE LEVEDURA DAS VERSÕES**

**TRUNCADAS DOS DERIVADOS DE K9SB2**

[0603] As versões truncadas com terminal N dos derivados de K9SB2 foram preparadas conforme descrito no exemplo 41, com modificações. O iniciador Kshort1 foi substituído pelo iniciador 5'-fosforilado KPSH1 (AAACAGTATG GCT AAG ATT TAC TAC CAA GAA GAC TG; SEQ ID NO: 906) que foi sintetizado pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville IA). K9SB2 na PCR foi substituído por misturas agrupadas das variantes (plasmídeos pBAD.KARI) listadas na Tabela 39. Os produtos de PCR purificados foram digeridos com SfiI e ligados aos sítios PmeI e SfiI de pHR81-Pllv5-KARI-K9.G9. O sequenciamento de DNA com TempliPhi™ (GE

Healthcare) e Iniciadores pHR81-F (ACACCCAGTATTTTCCCTTTCC) e pHR81-Rev (CTA GTG TAC AGA TGT ATG TCG G) (SEQ ID NOs: 924 e 925) foi realizado para identificar cada derivado truncado. As variantes identificadas são indicadas na Tabela 40. As sequências de codificação para as versões truncadas foram subclonadas subsequentemente nos sítios PmeI e SfiI do plasmídeo pLH744 e confirmadas por sequenciamento.

**TABELA 40. VERSÕES TRUNCADAS DOS DERIVADOS DE K9SB2**

Variante	ID de sequência de Aminoácido	ID de sequência de ácido nucleico
K9_David_SH	196	263
K9_Eliza_SH	266	907
K9_Frank_SH	267	908
K9_Grace_SH	389	909
K9_Ingrid_SH	405	910
K9_Jarvis_SH	781	911
K9_Kelly_SH	782	912
K9_Norman_SH	783	913
K9_Ophelia_SH	835	914
K9_Pat_SH	853	915
K9_Quentin_SH	854	916
K9_Ralph_SH	855	917
K9_Ursula_SH	856	918
K9_Watson_SH	857	858
K9_Xavier_SH	859	919

Construção de K9\_Zeke\_SH (K9SB2-K90M-T93A) e K9\_Annabel\_SH (K9SB2-K90M-T93I)

[0604] K9\_Zeke\_SH (SEQ ID NO: 860, proteína SEQ ID NO: 861) e K9\_Annabel\_SH (SEQ ID NO: 862, proteína SEQ ID NO: 863) foram derivados de K9\_David\_SH por meio da mutagênese direcionada que emprega o Kit QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis (nº de Catálogo 210518; Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, CA). Com exceção dos Iniciadores, modelos e ddH<sub>2</sub>O, todos os reagentes usados aqui foram supridos com o kit indicado acima. Os Iniciadores foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville IA).

[0605] Para K9\_Zeke\_SH, os Iniciadores empregados foram oMT93A (GATCCCAGATGAAATGCAGGCTGCCATGTACAAAAACGACATCG; SEQ ID NO: 920)) e oMT93Arev (CGATGTCGTTTTGTACATGGCAGCCTGCATTTTCATCTGGGATC; SEQ ID NO: 921). A mistura de reação continha 1 µl de K9\_David\_SH no vetor derivado de pHR81-PIIv5-KARI-K9.G9 (20 mg/µl), 1 µl de cada iniciador (150 mg/µl), 5 µl do tampão de reação 10x, 1 µl da mistura de dNTP, 1,5 µl de QuikSolution, 1 µl da enzima QuikChange Lightning e 38,5 µl de ddH<sub>2</sub>O. Para K9\_Annabel\_SH, os Iniciadores foram substituídos por oMT93I (GATCCCAGATGAAATGCAGGCTATCATGTACAAAAACGACATCG; SEQ ID NO: 922) e oMT93Irev (CGATGTCGTTTTGTACATGATAGCCTGCATTTTCATCTGGGATC; SEQ ID NO: 923).

[0606] As seguintes condições foram usadas para ambas as reações: A temperatura inicial foi 95 °C por 2 minutos seguidos por 18 ciclos de aquecimento/resfriamento. Cada ciclo consistia em 95°C por 20 segundos, 60°C por 10 segundos e 68°C por 6 minutos. Na conclusão da ciclagem de temperatura, as amostras foram retidas aguardando a recuperação de amostra a 4°C. 2 µl do Dpn I foram adicionados a cada reação e as misturas foram incubadas por 1 hora a 37°C. 2 µl de cada reação mutagênica foram transformados em *E. coli* Quimicamente Competente One Shot® Stbl3™ (Invitrogen, nº de Catálogo C7373-03) de acordo com as instruções do fabricante. Os transformantes foram espalhados em placas de agar que contêm o meio LB e 100 mg/ml de ampicilina (Cat nº L1004, Teknova Inc. Hollister, CA) e incubados a 37°C de um dia para o outro. Múltiplos transformantes foram, então, selecionados por TempliPhi™ DNA sequencing™ (GE Healthcare), que empregou os Iniciadores pHR81-F (ACACCCAGTATTTTCCCTTTCC; SEQ ID NO: 924) e pHR81- Rev (CTA GTG TAC AGA TGT ATG TCG G; SEQ ID NO:

925). As variantes com as sequências confirmadas (K9\_Zeke\_SH e K9\_Annabel\_SH nos vetores derivados de pHR81-PIIv5-KARI-K9.G9) foram subclonadas nos sítios PmeI e SfiI de pLH744 (SEQ ID NO: 930).

### **EXEMPLO 43**

#### **PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL DE K9SB2 E DERIVADOS CULTIVADOS SOB**

#### **CONDIÇÕES ANAERÓBICAS EM PLACAS DE 48 CAVIDADES**

[0607] Os plasmídeos de expressão de levedura para K9SB2, K9SB2\_SH e K9SB2-T93A, preparados com o vetor derivado de pLH744 conforme descrito no Exemplo 42, foram empregados para avaliar a produção de isobutanol na levedura cultivada sob condições anaeróbicas em uma placa de 48 cavidades. As cepas de produção de isobutanol foram feitas no hospedeiro PNY2259 (MATa *ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD\_Sm-PDC1t-P[FBA1]-ALS|alsS\_Bs-CYC1t pdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB\_Ax-PDC5t gpd2Δ::loxP fra2Δ::P[PDC1]-ADH|adh\_HI-ADH1t adh1Δ::UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD\_Lg(y)-ADH1t yprcΔ15AΔ::P[PDC5]-ADH|adh\_HI-ADH1t ymr226cΔ ald6Δ::loxP*) pela transformação dos plasmídeos que contêm as sequências de codificação para os variantes de KARI e pelo plaqueamento no meio sintético sem uracila (etanol a 1% como a fonte de carbono). As colônias de levedura da transformação nas placas de SE-Ura apareceram após 3 a 5 dias de incubação a 30 °C. Pelo menos três colônias de cada variante foram remendadas em placas de SE-Ura novas e incubadas a 30 °C.

#### **CONDIÇÕES DE CULTIVO DE LEVEDURA**

[0608] Meio de cultivo aeróbico: Meio de SE-Ura com 2 g/l de etanol.

[0609] Meio de cultivo anaeróbico: SEG-Ura com 30 g/l de glicose e 1 g/l de etanol, suplementado com 10 mg/l de ergosterol, tampão de MES a 50 mM (pH 5,5), 30 mg/l de tiamina e 30 mg/l de ácido nicotínico.

[0610] Placas de 48 cavidades: Axygen nº de catálogo P-5ML-48-C-S, volume total de 5 ml/poço, volume de cultura de 1,5 ml/poço.

[0611] As placas foram cobertas com um filme adesivo permeável (VWR; número de catálogo 60941-086) para o cultivo aeróbico. As placas foram agitadas a 225 rpm a 30 °C. Para o cultivo anaeróbico, placas recentemente incubadas cobertas com um filme permeável foram purgadas de oxigênio pelo equilíbrio em uma câmara anaeróbica por 2 horas. As coberturas de placa foram, então, trocadas por coberturas de alumínio adesivas (VWR; número de catálogo 89049-034) e cada placa foi colocada em uma caixa de plástico impermeável (Mitsubishi Gas Chemical America, Inc; Nova York, NY; Catálogo 50-25) juntamente com um pacote de sequestrante de oxigênio novo (Mitsubishi Gas Chemical America, Inc; Nova York, NY; Catálogo 10-01). O conjunto inteiro (placa(s) e pacote de sequestrante de oxigênio dentro de uma caixa de plástico impermeável vedada) foi removido da câmara anaeróbica e agitado a 225 rpm a 30 °C.

### **PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

[0612] Colônias de levedura única em placas de agar de SE-Ura foram semeadas em placas de agar de SE-Ura e incubadas a 30 °C até que remendos densos de células tenham crescido. As pré-culturas líquidas em placas de 48 cavidades foram inoculadas com laços dessas células para o cultivo aeróbico inicial. Após a agitação de um dia para o outro, a OD<sub>600</sub> de cada poço de cultura foi medida pela transferência de 0,15 ml de cada poço em uma placa de 96 cavidades de fundo arredondado e pela medição da absorbância de cada poço a 600 nm com um leitor de placa Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Uma transformação linear com base em uma linha de calibração determinada experimentalmente foi aplicada a essas densidades ópticas medidas por leitor de placa para converter as mesmas em valores de absorbância comparáveis para um espectrofotômetro com base em cuveta.

[0613] Uma porção calculada de cada poço de pré-cultura aeróbica foi inoculada no poço correspondente de uma placa de 48 cavidades nova com 1,5 ml do meio de SEG-Ura, para alcançar uma OD<sub>600</sub> inicial (em unidades de absorbância de espectrofotômetro de cuveta) de 0,2. No processo de inoculação da placa nova, a placa de pré-cultura aeróbica foi centrifugada, o sobrenadante foi removido de cada poço e as células em cada poço foram ressuspensas no meio de SEG-Ura novo. Essa placa de cultivo anaeróbico foi agitada por 3 dias. A concentração de isobutanol nos sobrenadantes de cultura foi medida por HPLC (Tabela 41).

**TABELA 41. TITULAÇÕES DE ISOBUTANOL ALCANÇADAS NO PRIMEIRO CICLO DE PASSAGEM ANAERÓBICA**

Variante	nº de cavidades	Titulação de isobutanol média (mM)	Desvio padrão de titulação de isobutanol
K9SB2	16	35,2	11,9
K9SB2_SH	8	67,4	12,2
K9SB2-T93A	8	40,8	9,1

[0614] Um cultivo anaeróbico de acompanhamento foi iniciado a partir do primeiro cultivo anaeróbico conforme segue: Uma porção calculada de cada poço de cultura anaeróbica foi inoculada no poço correspondente de uma placa de 48 cavidades nova com 1,5 ml do meio de SEG-Ura, para alcançar uma OD<sub>600</sub> inicial (em unidades de espectrofotômetro de cuveta) de 0,2. No processo de inoculação da placa nova, a placa de cultivo foi centrifugada, o sobrenadante foi removido de cada poço e as células em cada poço foram ressuspensas no meio de SEG-Ura novo, a fim de minimizar o arrastamento de metabólitos de um cultivo para o próximo. A placa de cultivo anaeróbico de acompanhamento (segundo ciclo) foi agitada por 2 dias. A concentração de isobutanol nos sobrenadantes de cultura foi medida por HPLC (Tabela 42).

**TABELA 42. TITULAÇÕES DE ISOBUTANOL ALCANÇADAS NO SEGUNDO CICLO DE****PASSAGEM ANAERÓBICA**

Variante	nº de cavidades	Titulação de isobutanol média (mM)	Desvio padrão de titulação de isobutanol
K9SB2	16	67,6	10,8
K9SB2_SH	8	85,7	9,2
K9SB2-T93A	8	76,3	16,8

**EXEMPLO 44****CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DE K9G9, K9SB2 E K9SB2 SH**

[0615] K9G9, K9SB2, K9SB2\_SH foram sobre-expressa por meio dos plasmídeos pBAD.KARI na cepa de *E. coli* Bw251 13 (AilvC) e purificadas para a medição detalhada dos parâmetros cinéticos.

[0616] As análises cinéticas de cofator, purificação e expressão foram realizadas conforme descritas no exemplo 18, com as seguintes modificações. As culturas de expressão foram cultivadas em 20 ml de LB com 100 µg/ml de ampicilina e 0,2% (p/v) de arabinose em um frasco com tampa ventilada de 125 ml. O meio de expressão foi inoculado com 1/10 do volume da cultura de 8 horas. As culturas de expressão foram cultivadas por 18 horas para K9SB2 e 24 horas para K9SB2\_SH.

**TABELA 43. REAÇÕES DE COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS COM NADH E****NADPH**

Variante	SEQ ID NO:	V <sub>max</sub> de NADPH, U/mg	K <sub>m</sub> de NADPH, µM	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> de NADPH, l/min*mg	V <sub>max</sub> de NADH, U/mg	K <sub>m</sub> de NADH, µM	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> de NADH, l/min*mg
K9G9	644	2,2	24,1	0,091	1,9	78,2	0,024
K9SB2	427	1,7	44,8	0,038	1,8	11,6	0,155
K9SB2_SH	637	1,7	109,9	0,015	1,7	13,3	0,128

**EXEMPLO 45****PRODUÇÃO DE ISOBUTANOL DE K9SB2 E DERIVADOS**

[0617] A análise de produção de isobutanol em placas de 48 cavidades foi realizada, conforme descrito, no exemplo 42, com as seguintes modificações. Os meios de cultivo aeróbico e anaeróbico são iguais àqueles

descritos no exemplo 19, mas com 0,01% em p/v de histidina adicionado. Os valores de OD<sub>600</sub> das pré-culturas aeróbicas foram medidos com o uso de um espectrofotômetro Cary 300 (Agilent Technology, Wilmington, DE). Uma Heraeus Multifug X1R com um rotor M-20 (Thermo Scientific, Waltham, MA) foi usada para peletizar as células de pré-cultura aeróbica e o meio de cultivo usado foi descartado. As placas com péletes de célula foram transformadas na Coy Anaerobic Bag (Grass Lake, MI) e 100 µl do meio de cultivo anaeróbico foram adicionado a cada pélete. Permitiu-se que o meio de cultivo anaeróbico fosse desgaseificado por pelo menos 24 horas antes da placa de 48 cavidades receber 1,5 ml alíquotas; esse processo foi realizado dentro de uma bolsa anaeróbica. A placa de cultura anaeróbica foi inoculada com o volume apropriado da ressuspensão celular e coberta com uma folha de alumínio adesiva. As placas foram colocadas em um sistema MCG 2.5L AnaeroPack (MCG, Japão). A caixa foi vedada e removida da bolsa anaeróbica e colocada em um incubador de 30°C por 80 horas com agitação a 220 rpm. Três transformantes foram analisados por variante, seis transformantes foram analisados para K9D3 e K92B2 (Tabela 44).

**TABELA 44. TITULAÇÕES DE ISOBUTANOL**

Variante	SEQ ID NO:	Titulação de isobutanol, mM
K9D3	645	76,4 ± 9,7
K9SB2	427	93,8 ± 3,3
K9_Frank	440	27,8 ± 0,5
K9_Grace	445	89,4 ± 15,5
K9_Ingrid	455	88,3 ± 5,4
K9_Jarvis	437	91,8 ± 5,8
K9_Kelly	452	40,9 ± 4,5
K9_Norman	481	66,2 ± 10,6
K9_Ophelia	488	28,3 ± 5,3
K9_Pat	441	77,1 ± 25,6
K9_Quentin	495	80,1 ± 10,8
K9_Ralph	496	82,1 ± 21,3
K9_Sophia	502	25,3 ± 13,44
K9_Tiberius	509	11,4 ± 10,4
K9_Ursula	511	57,3 ± 26,2
K9_Victor	514	93,0 ± 11,4



[0618] A análise de produção de isobutanol em recipientes de soro foi realizada para selecionar variantes conforme descrito no exemplo 19 com as seguintes modificações. As variantes de KARI foram expressas na levedura dos plasmídeos derivados de pLH744, preparados conforme descrito no Exemplo 42. Histidina foi adicionada tanto à pré-cultura aeróbica quanto ao meio de cultivo anaeróbico a uma concentração final de 0,01% em p/v. Três ou quatro transformantes foram analisados por variante (Tabela 45, 46 e 47).

**TABELA 45. EXPERIMENTO DE TITULAÇÃO DE ISOBUTANOL**

Variante	SEQ ID NO:	Passagem	Horas	Titulação de isobutanol, mM	Isobutanol/ Glicerol
K9SB2	427	1	75	28,2 ± 6,85	2,11 ± 0,16
K9SB2_SH	637	1	75	87,9 ± 1,04	2,49 ± 0,04
K9SB2	427	2	48	85,0 ± 4,35	2,67 ± 0,06
K9SB2_SH	637	2	48	97,4 ± 4,79	2,49 ± 0,07

**TABELA 46. EXPERIMENTO DE TITULAÇÕES DE ISOBUTANOL 2**

Variante	SEQIDNO:	Passagem	Horas	Titulação de isobutanol, mM	Isobutanol/ Glicerol
K9SB2	427	1	44	30,2 ± 4,1	2,30 ± 0,15
K9SB2_SH	637	1	44	40,3 ± 5,6	2,41 ± 0,07
K9_David	431	1	44	36,2 ± 3,5	2,40 ± 0,10
K9_David_SH	196	1	44	41,9±6,4	2,37 ± 0,04
K9_Grace	445	1	44	40,2 ± 5,5	2,30 ± 0,05
K9_Pat	441	1	44	29,0 ± 3,1	2,35 ± 0,10
K9SB2	427	2	46	59,2 ± 0,6	2,61 ± 0,03
K9SB2_SH	637	2	46	74,8 ± 3,0	2,58±0,03
K9_David	431	2	46	63,8 ± 0,6	2,65 ± 0,06
K9_David_SH	196	2	46	76,7 ± 1,5	2,53 ± 0,04
K9_Grace	445	2	46	62,3 ± 3,1	2,52 ± 0,07
K9_Pat	441	2	46	50,1 ± 2,1	2,48 ± 0,07

**TABELA 47 TITULAÇÕES DE ISOBUTANOL**

Variante	SEQIDNO:	Passagem	Horas	Titulação de isobutanol, mM
K9SB2	427	2	50	66,2 ± 1,8
Annabel_SH	862	2	50	74,4 ± 2,4
Zeke_SH	860	2	50	76,8 ± 8,3

HMMER2.0(2.2g) NOME KARIs Verificadas por Funcionalidade	Versão de formato de arquivo: um identificador exclusivo para esse formato de arquivo salvo. Nome do perfil HMM
--	---

	Variante	SEQIDNO:	Passagem	Horas	Titulação de isobutanol, mM																
LENG 354 Amino ALPH MAP sim			Comprimento de Modelo: a quantidade de estados de correspondência no modelo Alfabeto de símbolos: Isso determina o alfabeto de símbolos e o tamanho das distribuições de probabilidade de emissão de símbolo. (Amino, o tamanho de alfabeto é estabelecido em 20 e o alfabeto de símbolos em "ACDEFGHIKLMNPQRSVWY" (ordem alfabética). Indicador de anotação de mapa: se estabelecido que sim, cada linha de dados para a coluna de estado/consenso de correspondência na seção principal do arquivo é seguida por um número extra. Esse número gera o índice da coluna de alinhamento a partir de qual o estado de correspondência foi feito. Essas informações fornecem um "mapa" dos estados de correspondência (1..M) nas colunas do alinhamento (1.alen). O mesmo é usado para alinhar rapidamente o modelo de volta para o alinhamento original, por exemplo, ao usar hmmlalign-mapali. Linha de comando para cada comando HMMER que modifica o arquivo salvo: Esse significa que hmmbuild (parâmetros padrão) foi aplicado para gerar o arquivo salvo. Linha de comando para cada comando HMMER que modifica o arquivo salvo: Esse significa que hmmlcalibrate (parâmetros padrão) foi aplicado ao arquivo salvo. Número de sequência: o número de sequências em que o HMM foi treinado Data de criação: Quando o arquivo salvo foi gerado. Oito transições "especiais" para controlar partes das partes com especificidade para algoritmo do modelo de Plano 7. A probabilidade nula usada para converter esses de volta para as probabilidades de modelo é 1.0. A ordem dos oito campos é N->B, N->N, E->C, E->J, C->T, C->C, J->B, J->J. A distribuição de probabilidade de transição para o modelo nulo (estado G único). Os parâmetros de distribuição de valor extremo μ e lambda respectivamente; ambos valores de ponto flutuante. Esses valores são definidos quando o modelo é calibrado com hmmlcalibrate. Os mesmos são usados para determinar os valores E de pontuações de bit.																		
	ild n KARIs Verificadas por Funcionalidade exp-KARI.hmm exp-KARI_mod.aln alibrate exp-KARI.hmm ec 8 17:34:51 2008 -1000-1000-8455 -4 -8455 -4 55 558 85 338 -294 453 -1158 197 249 902 -1085 -142 -21 -313 45 531 201 384 -1998 -644 2708 0.110102																				
	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento	
	i->m	m->i	m->d	i->m	i->i	d->m	d->d	b->m	m->e												
	-650		-1463																		
1(Q)	-648	-4356	-136	-44	-1453	-1166	-219	-1455	321	-1417	-911	-227	-1496	3263	122	-643	-684	-1239	-1542	-1030	7100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

		Variante		SEQIDNO:					Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM							
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-701	-1378	-650	*													
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento	
2(M)	-4231	-3929	-5216	-5402	-3438	-4370	-4528	-3232	-5113	-2613	5320	-5052	-4790	-4977	-4823	-4692	-4459	-3629	-4103	-4017	7200%	
-	-147	-501	232	42	-382	397	104	-625	209	-467	-722	276	396	44	95	361	121	-368	-296	-251		
-	-3303	-3318	-325	-3473	-136	-701	-1378	*	*													
3(F)	-1308	-1104	-2227	-2120	3516	-2093	-244	-196	-1891	64	66	-1626	-2276	-1503	-1798	-1617	-1350	-389	305	1335	8600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-943	-1060	*	*													
4(A)	1616	-1744	1125	33	-2015	-1540	-262	-1686	937	-1765	-911	-252	-1658	154	-383	-488	640	-3	-2038	-1421	8700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-721	275	394	45	96	359	118	-369	-295	-249		
-	-901	-7402	-1125	-894	-1115	-2352	-314	*	*													
5(C)	-346	2578	1084	-712	2092	-1540	-384	-167	-624	-482	125	-731	-1705	-451	-883	-631	-338	-50	-774	-133	8800%	
-	-149	-500	235	43	-381	398	106	-626	210	-466	-721	275	394	45	96	359	118	-369	-295	-249		
-	-1009	-1006	-7567	-131	-3527	-1916	-444	*	*													
6(S)	800	-586	-1937	-1415	-821	-1740	-954	1279	-1204	-584	19	-1258/	-1964	-1013	-41358	1715	-473	1117	-1320	-938	9000%	
-	-149	-500	233	43	-381	398	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-17	-6953	-7995	-894	-1115	-146	-3378	*	*													
7(K)	-956	-2411	-803	501	-2743	-1919	-558	-2486	2435	-2420	-1502	57	-2010	1146	458	829	224	-2040	-2577	-1913	9100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
8(V)	-2472	-2010	-5089	-4702	-2534	-4789	-4391	2241	-4574	-151	-1318	-4442	-4600	-4417	-4628	-4080	-82	3023	-3952	-3510	9200%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
9(Y)	-4673	-3685	-5210	-5505	2423	-5069	-1332	-3424	-5065	-392	-2838	-3726	-4920	-3835	-4458	-4313	-4533	-3643	-581	4349	9300%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
10(Y)	-2170	-2625	-2489	-2097	-1555	-2986	-148/1	-2628	906	-2674	-2098	-2051	-3206	-15813	-1078	-2258	1039	-2435	-2009	4185	9400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
11(O)	-2498	-4412	3500	1042	-4581	-2437	-1765	-4500	733	-4361	-3682	515	-2961	-1429	-2799	-2158	-2558	-3974	-4550	-3541	9500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
12(K)	11	-2371	348	819	-2692	-535	-527	-2443	2294	-2387	-1461	590	-1960	-68	904	-67	-837	-1993	-2554	-1871	9600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													

			Variante			SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM												
13(D)	-2663	-4633	3700	580	-4789	-2487	-1872	-	4738	731	-4578	-	-	3963	1073	-3046	-1551	-2987	-	2292	-2742	-	-4759	-	3709	9700%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																					
			C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento								
14(C)	2503	3193	-4266	-3818	-2010	-3276	-2896	762	-3517	-1437	-	-	-3509	-3212	-3411	-	2499	-1792	1507	-2796	-	2431	9800%							
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																					
15(D)	-1363	-2905	2748	542	-3202	-2072	-920	-	2977	290	-2912	-	1270	-2294	-489	-1186	53	1116	-	2518	-3086	-	2349	9900%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																					
16(L)	-1268	-1113	-3338	-540	-1057	-2827	-1716	569	-2409	2299	-236	-	2381	-2862	-2089	-2316	-232	-1213	1306	-1645	-	1304	10000%							
-	-149	-500	233	43	-381	399	-106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																					
17(S)	-1350	-2877	588	1045	-3189	-496	-920	-	2963	-628	-2901	-	2011	1860	-2289	-489	-1184	2139	190	-	2503	-3077	-	2343	10100%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	*	*																					
18(G)	-454	-832	-968	-1110	-2112	3143	-1211	-	2091	-1317	-2264	-	1691	-978	-1499	-1202	-1421	-646	-774	-	1550	-1916	-	1919	10200%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*																					
19(H)	-898	-1313	-545	-482	-320	-1336	4297	-	1552	-160	-1493	-	1035	-579	-1675	-363	-322	-934	-951	-	1354	-725	107	10300%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*																					
20(D)	-872	-1812	3234	432	-2215	-967	-433	-	2172	-569	-2269	-	1704	99	-1453	-184	-1141	-728	-973	-	1814	-2146	-	1646	10400%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*																					
21(E)	-766	-1695	521	2831	-2050	-1029	-293	-	1804	-118	-1919	-	1331	69	-1441	-4	-527	-653	-814	-	1512	-1998	-	1505	10500%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*																					
22(Y)	-1337	-1229	-1681	-1596	1268	-1957	121	-918	-1294	-769	-585	-	1229	-2163	-1111	-1301	-	1443	-1359	-932	592	3932	10600%							
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-109	-3775	*	*																					
23(I)	-1337	-1931	-4749	-4227	-1724	-4227	-3320	2306	-3952	1990	-634	-	3878	94	-3538	-3812	-	3411	-2247	1576	-2891	-	2629	107005						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249										
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																					

	Variante			SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM						
24(I)	-2801	-2299	-5406	-5003	-2108	-5164	-4649	3051	-4886	1593	-869	-	-4788	-4454	-4829	-	-2764	1435	-3781	-		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
25(K)	-234	-2632	306	-500	-3007	-2141	-719	-	2540	-2619	-	-778	-2231	2257	968	-	-1152	-	-2738	-	10900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
			C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
26(G)	-2184	-39001	796	392	-4174	2903	-1580	-	-1636	-3937	-	-967	-2810	-1	-2362	1069	-2220	-	-4130	-	11000%	
-	-149	-501	233	42	-375	399	104	-625	210	-463	-722	276	396	44	96	358	116	-371	-296	-251		
-	-155	-3318	-9181	-3674	-118	-701	-1378	*	*													
27(K)	-3243	-3775	-4129	-2558	-4750	-3647	-1490	-	3681	-3617	-	-	-3580	-1076	1318	-	-2876	-	-3395	-	12600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
28(K)	-1684	-2925	-1665	-979	-3407	-2535	-923	-	2737	-2865	-	-	-2581	1301	804	-	1681	-	-2905	-	12700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
29(V)	-2623	-2122	-5300	-4990	-2769	-5101	-5131	2388	-4945	-1532	-	-	-4868	-4890	-5101	-	-2619	3219	-4505	-	12800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
30(A)	3309	-1828	-4057	-4294	-4382	656	-3657	-	-4169	-4428	-	-	-3694	-3937	-	59	-	-4610	-	12900%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
31(V)	-2625	-2122	5304	-4993	-2772	-5111	-5142	-	-4950	-1532	-	-	-4873	-4896	-5108	-	-2621	2896	-4512	-	13000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
32(I)	-2790	-2287	-5403	-5009	-2155	-5170	-4698	3324	-4899	1175	-912	-	-4802	-4495	-4860	-	-2757	1192	-3838	-	13100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
33(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-	-5765	-6297	-	-	-4804	-5546	-5385	-	-4815	-	-4924	-	13200%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
34(Y)	-4838	-3766	-5229	-5579	1502	-5108	-1300	-	-5134	-3040	-	-	-4963	-3861	-4500	-	-4689	-	2986	4507	13300%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
35(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-	-5765	-6297	-	-	-4804	-5546	-5385	-	-4815	-	-4924	-	13400%	

Variante			SEQIDNO:						Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
36(S)	-1473	-2007	-3647	-3780	-3430	-2363	-3314	228	-3616	-3373	-	-	-3093	-3395	-3541	3475	-1185	-	-	-	13500%
											2876	2840					2307	-3927	3474		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
37(Q)	-4589	-4392	-3927	-4146	-5099	-4221	-4099	-	-3840	-5564	-	-	-4693	4575	-3826	-	-4772	-	-4577	-	13600%
								5973			5304	4230				4704		5612		4751	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
38(G)	677	-2128	-3838	-4171	-4647	3536	-3816	-	-4340	-4749	-	-	-3419	-3871	-4137	-	-2005	-	-4725	-	13700%
								4506			3857	3009				1784		3297		4735	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
39(H)	-2667	-3375	-2682	-2114	-3744	-3201	4738	-	-445	-3553	-	-	866	-1265	1506	-	-2557	-	-3282	-	13800%
								3782			2886	2112				2614		3469		2908	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
40(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-	-4818	-5025	-	-	-3728	-4477	-4545	-	-2762	-	-4724	-	13900%
								4781			4365	3727				2567		3852		4942	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
41(H)	-3103	-3404	-2950	-2573	-783	-3679	4549	-	-1372	-3071	-	-	-3764	2546	-1428	-	-2976	-	2269	-295	14000%
								3407			2715	2454				2990		3308			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
42(A)	3357	-1795	-4134	-4277	-4057	-2118	-3548	-	-4035	-4024	-	-	-2900	-3608	-3823	217	-1660	-276	-4363	-	14100%
								3549			3192	2817								4211	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
43(Q)	-1061	1950	-2044	-1475	-1236	-2372	-1154	-789	-1218	1062	1123	743	-2446	2895	-1441	-	-1005	-693	-1678	-	14200%
																1392				1278	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
44(N)	-4000	-4117	-3389	-3749	-5073	-3911	-4123	-	-4503	-5797	-	-	-4479	-4255	-4592	-	-4312	-	-4650	-	14300%
								6022			5419	4397				4115		5371		4731	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
45(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	-4980	-4628	-	-5423	3316	-	-	-4997	-4750	-5002	-	-4399	-	-3665	-	14400%
								1886			1236	5514				5379		2629		3690	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
46(R)	-1731	-3015	275	-931	-3487	-2518	-973	-	-2321	-2955	-	-	-2603	256	2808	-	-1613	-	-2995	-	14500%
								3116			2123	224				1596		2730		2515	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

	Variante			SEQIDNO:					Passagem		Horas				Titulação de isobutanol, mM						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
47(D)	-2896	-4843	3855	944	-50347	-2600	-2082	-5082	-2528	-4903	-4373	-1209	-3196	1786	-3536	-2501	-3007	-4517	-5004	-3956	14600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
48(S)	-1536	-2212	-2363	-2679	-4293	-2279	-3082	-4365	-3331	-4524	-3676	288	-3026	-2967	-3497	3508	-1962	-3259	-4477	-4066	14700%
-	-148	-500	232	44	-381	398	105	-627	211	-465	-721	275	393	45	95	360	118	-370	-295	-250	
-	-155	-3318	-9181	-2405	-302	-701	-1378	*	*												
49(G)	-2521	-3968	1232	-911	-4849	3373	-2126	-4854	-2535	-4752	-4136	-53	-3115	-1836	-3440	-2284	-2716	-4157	-4880	-3914	15400%
-	-149	-500	5233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
50(V)	-2767	-2324	-5232	-4770	396	-4827	-3784	-36	-4546	848	-611	-4472	-4518	-3980	-4367	-4081	-2716	3323	-3037	-2660	15500%
-	-148	-500	233	43	-381	399	106	-626	211	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-148	-3381	-9181	-203	-2928	-7041	-1378	*	*												
51(D)	-1684	-3285	2735	2014	-3554	-2196	-1177	-3350	92	-3279	-2427	692	-2505	-770	-1595	-1483	-1666	332	-3460	-2676	15700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
52(V)	-3122	-2888	-5092	-5160	-3522	-4180	-4687	-905	-5060	-2626	-2570	-4662	-4579	-4940	-4923	-4013	-3297	3796	-4414	-4190	15800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
53(V)	369	366	-3075	-2462	-883	-2557	-1420	1415	378	-757	-117	-209	-2610	-1809	-2037	-1630	1166	2145	-1385	-343	15900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
54(V)	-2624	-2122	-5302	-4991	-2772	-5108	-5139	2623	-4948	-1533	-1475	-4794	-4871	-4894	-5106	-4488	-2620	3088	-4511	-3996	16000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
55(G)	929	-2107	-3852	-4182	-4633	3492	-3809	-4486	-4335	-473	-3835	-2997	-3132	-3863	-4127	-1761	-1982	-3275	-4720	-4725	16100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
56(L)	-3427	-2938	-5791	-5325	-1449	-5374	-4410	-543	-5063	3041	-255	-5207	-4820	-4126	-4691	-4757	-3351	883	-3184	-3234	16200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
57(R)	-3040	-3724	-3266	82	-4620	-3470	-1396	-3905	804	-3529	-2874	-2133	-3439	-978	3800	-2894	-2709	-3682	-3353	-3267	16300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												

Variante			SEQIDNO:					Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM							
58(K)	31	-2412	-803	1532	-2743	-1920	-559	-2483	1722	-2421	-1503	-556	1229	727	1079	-566	-893	-2041	-2579	-1915	16400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
59(G)	-2671	-4661	1614	587	-4832	3103	-1901	-4806	-2269	-4648	-4047	421	-3049	-1587	-3230	-2297	-2766	-4245	-4850	-3752	16500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
60(S)	-1499	-2308	-1932	-1859	-4006	1604	-2121	-3754	1362	-3793	-2945	-1833	-2827	-1794	-1902	2738	-1771	-2970	-3910	-3479	16600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-247	-8139	-2699	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
61(K)	1362	-2232	-619	-98	-2567	-427	-435	-2309	1599	-2265	-1349	1101	-1861	886	-41	833	-740	-1868	-2441	-1767	16700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-9	-7900	-8943	-894	-1115	-344	-2238	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
62(S)	-1268	-1904	-3742	-4011	-4384	-2155	-3593	-4209	-3996	-4479	-3573	-2789	-2948	-3606	-3832	3517	228	-3028	-4600	-4451	16800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
63(W)	726	-873	-3261	-2634	1926	-2567	-1425	660	-2252	-701	-68	-2174	-2617	-1898	18	-1648	-972	983	4091	-958	16900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
64(E)	1527	-2404	212	1636	-2722	-1878	-556	-626	1241	-2419	-1497	350	-1985	-100	-659	96	70	-2025	-2589	-1903	17000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
65(K)	-8	-5575	-895	770	-2502	-1963	-609	-2192	2589	22	-1353	-631	-2052	692	-617	-889	-906	-361	-2455	-1836	17100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
66(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-4781	-4818	-50258	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2567	-2762	-3852	-47247	-4942	17200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
67(Q)	-1006	-2441	-869	1767	-2780	-1965	-586	-2510	1702	-2445	-1534	-603	-2052	1923	873	-888	236	-630	-2596	-1949	17300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
68(A)	1489	-2393	167	1234	-2711	-1873	-547	-2462	895	-2408	-1485	1161	-1977	-90	-648	666	141	-2014	-257	-1892	17400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												



	Variante			SEQIDNO:					Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM							
69(D)	2104	-2898	2124	985	-3163	-2096	1397	-2935	-693	-2897	-2025	-723	-2329	-543	-1250	-1245	-1368	-2501	-3087	-530	17500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
70(G)	-2294	-2898	-2521	-2885	-4852	3641	-3456	-5042	-3796	-5094	-4356	365	-3545	-3376	-4005	-2451	-2700	-3996	-4706	-4575	17600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
71(F)	-2596	-2266	-74685	-4188	3199	-4136	1018	505	-3812	1986	-405	-3595	-3961	-3157	-3524	-327	-2509	-1337	-1621	-840	17700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
72(V)	47	-2348	338	950	-2668	-1854	-512	-507	1721	-2364	-1438	-490	-1947	672	436	806	687	-1970	-2533	-1851	17800%	
-	-149	-500	232	46	-381	399	106	-626	210	-466	-721	277	393	45	95	359	119	-370	-295	-250		
-	-155	-3318	-9181	-2159	-366	-701	-1378	*	*													
73(V)	-1810	-1639	-4149	-3689	-1869	-3417	-2822	29	-3369	320	-897	-3230	112	-3099	-3291	-2619	-767	3269	-2709	-2354	18400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento	
74(K)	847	-1093	-2131	-1554	304	127	-1127	-637	1445	645	1186	-1534	-2401	-1174	-1547	-764	-172	-528	-1519	1413	18500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
75(T)	-1284	-2794	1526	1290	-3096	-2041	1289	-2863	-548	-2808	-1914	-668	-2242	-427	-1095	1451	1827	-2411	-2986	-2264	18600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
76(V)	-1089	-957	-3143	-2535	-943	-2618	-1496	1052	-2198	-792	1859	-146	686	-1884	-2111	-1695	945	2346	-1458	-1106	18700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
77(W)	1606	-2321	-752	612	-2628	-323	-527	-2366	1480	-2331	-1416	-510	-789	-73	421	23	-829	-1936	2212	-1843	18800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
78(E)	-1509	-3540	1372	3127	-3861	-120	-1391	-3685	-1319	-3605	-2787	-900	-2659	-1005	-1976	-400	-655	-3194	-3790	-2957	18900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
79(A)	3390	-1868	-4092	-4341	-4332	-2153	-3680	-3942	-4157	-4333	-3471	-2869	-2948	-3730	-3919	-1525	931	-2894	-4580	-4483	19000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
80(V)	2003	-1721	-4449	-3995	-2160	-3763	-3240	1342	-3745	-1435	-	-	-3855	-3494	-3700	-	-58	2574	-3091	-	19100%	

Variante				SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM					
											1124	3561				2979				2698	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
81(K)	1714	-2501	-959	446	-2858	-2043	-654	-2574	1964	-2506	-1609	-689	-2135	-203	1088	428	-1032	-2148	-2652	-2027	19200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
82(W)	265	-2347	815	432	-2663	634	-519	-2410	619	-2361	-1438	-495	-1952	1955	-609	-382	147	-1966	2858	-1853	19300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
83(A)	3391	-1860	-3998	-4279	-4411	-2128	-3684	-4207	-4197	-4490	-3565	-2837	-2929	-3729	-3959	706	-1718	-3001	-4636	-4534	19400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
84(D)	-2747	-4795	3813	396	-4912	-2496	-1935	-4905	-2324	-4735	-4166	-1079	-3082	603	-3296	-2353	-2844	-4347	-4929	-3809	19500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
85(V)	-2717	-2200	-5338	-47951	-2254	-5099	-4670	1963	-4844	1553	-1011	-4759	-4770	-4509	-4836	-4427	-2688	2741	-3899	-3628	19600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
86(V)	-2635	-2129	-5306	-4970	-2652	-5125	-5011	2554	-4915	-354	-1368	-4781	-4852	-4798	-5038	-4487	-2622	3019	-4355	-3902	19700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
87(M)	-1340	-1208	-3317	-2708	-968	-2860	-1708	577	-2346	932	4131	-2382	-2878	250	-2265	-228	-1278	-506	-1629	-1313	19800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
88(I)	-2566	-2177	-5017	-4470	669	-4496	-3487	2791	-4191	1116	1394	-4156	-4228	-3615	-3972	-3687	-2499	1692	-2860	-2711	19800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
89(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	-4980	-4628	-1886	-5423	3316	-1236	-5514	-4997	-4750	-5002	-5379	-4399	-2629	-3665	-3690	20000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
90(I)	1212	-1286	-3846	-3262	-1360	-3195	-2166	1616	-2918	1031	-493	-2824	-3211	-2583	-2782	-2308	1598	1299	-2020	-1668	20100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
91(P)	-1614	-2214	-3396	-3710	-4516	-2407	-3618	-4516	-3976	-4705	-3849	-2890	3993	-3625	-3900	656	-2068	-3354	-4610	-447	20200%

Variante				SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
92(D)	-4580	-4701	4174	-3014	-5700	-3967	-3905	-6376	-4478	-6024	-5744	-3355	-4501	-3870	-4926	-4440	-4750	-5894	-4922	-5231	20300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
93(E)	-1123	-2199	-983	2715	-2589	-2046	-942	-2250	-625	-2356	1979	-870	-2250	-554	-1093	463	932	-1902	-2660	-2064	20400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
94(H)	399	-1137	-2012	-14	1582	-2306	1600	246	-14252	190	-325	-1456	-2374	1474	-1479	-94	-905	896	-1557	-1158	20500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
95(Q)	-2742	-3142	-2766	-2681	-2790	-3344	-2460	-160	-1802	-2456	-2353	-2682	-3710	4317	-1866	-2894	-2844	-2559	-3295	-2711	20600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
96(A)	1981	-2315	-809	-268	-2645	-531	-579	-2374	232	-2350	-1445	-567	1217	711	445	447	-874	-1951	-2540	-1883	20700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
97(D)	491	-2351	1394	1381	-2671	-1854	1062	-2421	1010	-2367	-1440	-489	-1947	1017	362	-760	250	-623	-2535	-1852	20800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
98(V)	-2039	-1706	-4456	-3939	-1846	-3939	-3049	1986	-3656	1460	-826	804	-3870	-335	-3565	-3105	-2000	2330	-2796	-2442	20900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
99(Y)	-4840	-3766	-5230	-5581	1898	-5109	-1300	-3727	-5135	-3041	-3132	-3723	-4964	-3861	-4501	-4357	-4690	-3883	3225	4377	21000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
100(E)	-163	-2353	734-	1681	-2674	-1859	888	-2422	1668	-792	-1443	777	-1952	890	286	-766	238	1975	-2536	-1856	21100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-257	-8139	-2649	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
101(E)	1017	-2763	862	2042	-3060	-1913	-775	-2836	-495	-2773	-1886	1956	-2143	-136	-1056	265	-1185	-2377	-2948	-2207	21200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-9	-7891	-8933	-894	-1115	-338	-2261	*	*												
102(E)	-944	-2422	863	2138	-2740	-436	-567	-2493	894	-2437	-1515	-518	-1994	1767	-673	109	-885	-1023	-2605	-1917	21300%
-	-19	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

Variante			SEQIDNO:						Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM						
-	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
103(I)	-2660	-2156	-5316	-4965	-2520	-5119	-4900	3165	-4894	294	-1251	-4775	-4828	-4705	-4975	-4470	-2642	2240	-4202	-3814	21400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
104(E)	1068	-2341	-760	2003	628	-1887	-876	-2390	1240	-2347	-1436	-529	-1983	881	-618	-804	-855	-1954	-2530	-1862	21500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
105(P)	-343	-3144	1561	442	-3538	-489	-1216	-3329	-1038	-3274	-2420	-848	2974	-812	-1635	469	-1644	-2849	-3462	-2693	21600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
106(N)	-1173	-2375	-814	827	-2376	-2071	1767	-2279	-479	-2336	-1509	3151	-2218	-415	-957	-1093	-1120	-198	-2486	647	21700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
107(M)	-3415	-2890	-5826	-5252	-1352	-5488	-4282	1361	-5022	2621	2728	-5181	-4778	-4005	-4613	-4776	-3292	69	-3071	-3194	21800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
108(K)	-1941	-308	-1997	-1232	-3650	-2740	-1025	-3210	3059	-3010	-2208	499	-2766	1457	1261	-1817	-90	-2858	-3002	-2622	21900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
109(P)	1129	-2426	-740	964	-2747	-1913	-589	-2491	1139	-2440	-1525	-552	1941	1446	-655	-480	-913	-2050	-2610	-1935	22000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
110(G)	-2276	-2907	-2347	-2709	-4832	3554	-3349	-5005	-3678	-5053	-4315	1193	-3507	-3243	-3937	-2418	-2674	-3974	-4703	-4521	22100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
111(A)	1730	-2349	958	-198	-2661	-1868	-535	-2405	927	-2362	-1444	414	-1966	788	-630	790	-840	-303	-2540	-1863	22200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
112(T)	1350	-1149	-14	-1451	-1155	-2314	-1111	758	-1275	-1024	1167	-1475	-2388	-1111	-1501	334	1843	354	-1581	-1182	22300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
113(L)	-3333	-2796	-58069	-5293	-1506	-5535	-4502	1096	-5103	2935	-282	-5232	-4857	-4172	-4762	-4864	-3236	506	-3264	-3351	22400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												

	Variante				SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM				
114(A)	1769	-1525	158	-857	-1603	148	-891	-1181	-752	187	-712	-1040	-2228	660	-1135	-1111	-913	1305	-1913	-1442	22500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
115(F)	-4110	-3437	-5436	-5431	4216	-5143	-2159	-1742	-5074	563	-1124	-4290	-4871	-3987	-4561	-4547	-4016	-2374	-1356	-292	22600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
116(A)	3091	-1829	-3998	-4219	-4413	119	-3637	-4216	-4134	-4469	-3523	-2798	-2896	-2656	-3927	1514	-1679	-2983	-4632	-4539	22700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
117(H)	-5197	-4539	-4720	-5009	-4036	-4506	5435	-6314	-4911	-5786	-5667	-4954	-4960	-5011	-4732	-5391	-5395	-6022	-4063	-3641	22800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
118(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	22900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
119(F)	-4044	-3387	-5534	-5444	4093	-5246	-2370	-1514	-5107	1089	-868	-4443	-4880	-3998	-4592	-4639	-3934	-2200	-1536	-523	23000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
120(N)	885	-1899	-2020	-1781	-2956	-2135	-1925	-2602	-1809	3	-2052	3468	-2633	-1676	-2141	413	-1437	-2139	-3194	-2737	23100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
121(I)	-2673	-2169	-5324	-4969	-2477	-5123	-4876	3293	-4893	358	-1211	-4780	-4824	-4681	-4961	-4472	-2653	1969	-4158	-3791	23200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
122(H)	-3381	-3705	-3197	-3491	-4166	638	5216	-5496	-3798	-5304	-4811	-3481	-4185	-3770	-3879	-3508	-3702	-4793	-4170	-3759	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
123(Y)	-4816	-3757	-5210	-5549	3410	-5097	2153	-3719	-5105	-3041	-3127	-3715	-4955	-3851	-4483	-4344	-4669	-3870	-547	3677	23400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
124(G)	-1065	-2519	948	-272	-2820	1844	998	-2566	972	-284	-1622	1553	-2090	-229	-802	-938	-1011	-2133	-2708	-2021	23500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												

	Variante			SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM					
125(Q)	-412	-2285	-2466	-2186	-2068	-2877	-2019	-1589	-1588	1526	-1121	-2187	-3153	3585	-1718	-2137	-1964	-1719	-2789	-2414	23600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
126(I)	-2254	-1916	-4813	-4439	-2466	-4221	-3932	3248	-4248	-1515	-1324	-4044	-4259	-4063	-4255	230	-2280	2003	-3673	-3237	23700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
127(K)	-888	-2234	334	1172	-2504	-1881	-543	-93	1370	-300	-1337	465	-1974	655	-646	-794	-827	1255	-2448	-1798	23800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
128(P)	715	-1925	-3618	-3897	-4464	653	-3594	-4274	-4053	-4520	-3596	-2770	3775	-3593	-3911	-1550	-1770	-3067	-4647	-4548	23900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
129(P)	479	-2398	-1173	-637	-2915	-2106	-848	-2610	-289	-2586	-1713	-884	2238	1247	2195	51	-1147	-2184	-2757	-2174	24000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
130(A)	1787	-2663	1377	529	-2976	-1992	-762	-2736	1785	-2680	-1776	-623	-2161	-319	-936	297	-1120	-2285	-2853	-2146	24100%
%	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
131(F)	-1308	-1104	-2227	-2120	3516	-2093	-244	-196	-1891	64	66	-1626	-2278	-1503	-1798	-1617	-1350	-389	305	1335	24200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*												
132(P)	-603	-937	-997	-1058	-1832	-1041	-1092	-1737	-1074	-1874	-1416	-992	3539	-1065	-1192	-789	-866	-1383	-1765	-1661	24300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*												
133(K)	-804	-1483	-564	-230	-1920	-1335	-101	-1605	2889	-1630	-1021	-349	-1569	232	698	-786	-759	-1358	-1637	-1317	24400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-109	-3775	*	*												
	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento	
134(D)	-2405	-4159	3349	-651	-4260	-261	-1744	-4307	-1947	-4207	-3514	2151	-2936	-1416	-2754	-2102	-2471	-3802	-4324	637	24500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
135(I)	-2047	-1713	-4504	-3983	-1821	-3943	-3061	2461	-3697	1581	-797	-3593	-3873	-3371	-3587	-342	-2009	1904	-2784	-2441	24600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
136(D)	-2024	-3444	3495	-680	-3868	-2331	-1596	-44	-1632	-3675	-	685	-2782	-1248	-2305	478	-2088	-	-3911	-	24700%

Variante				SEQIDNO:					Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM						
											2915						3196		3098				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
137(V)	-3122	-2888	-5092	-5160	-3522	-4180	-4687	-905	-5060	-2626	-2570	-4662	-4579	-4940	-4923	-4013	-3297	3796	-4414	-4190	24800%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
138(I)	-53	-875	-3230	-2609	1867	-393	-1422	2613	-2236	-723	-81	-2157	-2608	-1885	-2086	-1633	276	-271	-1325	844	24900%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
139(M)	315	-2345	-4754	-4279	-1396	-4001	-3301	-697	-3877	816	4676	-3879	-3994	-3361	-3676	-3242	-2531	-1114	-2746	2629	25000%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
140(V)	-2623	-2122	-5301	-4990	-2770	-5102	-5132	2415	-4945	-1532	-1474	-4791	-4889	-4890	-5102	-4483	-2619	3206	-4506	-3991	25100%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
141(A)	3405	2528	-4529	-4796	-4340	-2257	-3851	-3901	-4447	-4351	-3532	-3057	-3052	-3976	-4112	-1643	-1844	-2929	-4572	-4519	25200%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
142(P)	-4953	-4392	-5213	-5573	-5853	-4408	-5077	-6679	-5790	-6281	-6067	-5357	4310	-5648	-5396	-5166	-5197	-6092	-4900	-5786	25300%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
143(K)	-4484	-4357	-4380	-3992	-5413	-4239	-3307	-5555	3994	-5171	-4707	-3921	-4535	-3079	-2169	-4529	-4408	-5264	-4403	-4729	25400%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
144(G)	2167	-1833	-3963	-4199	-4430	2715	-3642	-4236	-4146	-4489	-3540	-2795	-2898	-3661	-3939	910	-1682	-2994	-4647	-4556	25500%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
145(P)	-2604	-2948	-4094	-4235	-3511	-3269	-3767	-3353	-3912	-3066	2095	-3659	4036	-3912	-3822	-2883	-2963	-3249	-4027	-3787	25600%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento		
146(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	25700%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
147(H)	-2569	-3440	-1867	-1702	-3820	-2996	4731	-3830	634	-3639	-2963	-1838	1551	-1305	-748	-2470	-2510	-3482	-3434	-2990	25800%		

	Variante			SEQIDNO:					Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
148(T)	194	-1498	-3255	-2899	-2240	-2226	-2291	-1754	-2652	1634	-1430	-2330	-2747	-2399	-2684	567	2687	-1484	-2682	-2351	25900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
149(V)	-3122	-2888	-5092	-5160	-3522	-4180	-4687	-905	-5060	-2626	-2570	-4662	-4579	-4940	-4923	-4013	-3297	3796	-4414	-4190	26000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
150(R)	-4845	-4446	-5107	-4682	-5507	-4412	-3791	-5946	-2789	-5502	-5118	-4521	-4754	-3672	4219	-4989	-4832	-5644	-4538	-4993	26100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
151(R)	-962	-2395	-777	1012	-2721	76	1031	-2459	-142	-2413	-1501	-560	-2018	-128	2308	1224	-66	-2023	-2585	-1919	26200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
152(E)	-902	-2032	-899	2078	-2228	-1934	-611	-1897	-259	-221	-1156	520	-2024	816	-736	-858	1303	-287	-2295	537	26300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
153(Y)	-4820	-3765	-5219	-5565	3303	-5093	-1317	-3703	-5127	-3017	-3111	-3732	-4959	-3868	-4500	-4356	-4679	-3867	-565	4052	26400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
154(V)	129	-1901	-989	821	-2060	-1960	-654	-1704	498	-52	-1037	-703	-2057	695	-796	443	-344	1871	-2192	-1626	26500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
155(O)	576	-2355	344	1156	-2675	-1856	-515	-508	1502	-2370	-1444	571	-1949	1878	419	-764	-822	-1976	-2538	-1856	26600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
156(G)	-3239	-3889	516	-2361	-5355	3646	-3337	-5629	-3818	-5498	-4951	-2619	-3905	-3187	-4377	-3211	-3532	-4837	-4895	-4826	26700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
157(G)	753	-2516	-789	488	-2848	2300	-672	-2582	596	-2529	-1627	481	-2112	-224	471	-962	-1024	-2149	-2694	-2033	27300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
158(G)	-52	-2212	-3792	-4133	-4698	3627	-3843	-4580	-4356	-4812	-3937	-3058	-3216	-3901	-4170	-1874	-2095	-3384	-4734	-4766	27400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	



Variante			SEQIDNO:						Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
159(V)	-2485	-2030	-5123	-4769	-2667	-4797	-4593	2349	-4661	-1545	-1424	-4502	-4648	-4554	-4752	-4115	825	2986	-4159	-3678	27500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
160(P)	-2541	-3139	-2413	-2753	-4726	-2891	-3342	-5055	-3527	-5058	-4393	1199	4031	-3244	-3757	-2665	-2911	-4148	-4583	-4362	27600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
161(C)	1577	3078	1357	-656	-2664	-219	891	-2359	-617	-2434	-1576	-891	-2199	-545	-1093	872	-1043	-1946	-2701	-2102	27700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
162(L)	-2140	-2404	-3995	-3997	-2053	-3121	-3283	-1687	-3689	3041	-1200	-3360	-3626	-3433	-3567	480	-2414	-1973	-3145	-2755	27800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
163(I)	-2527	-2092	-5072	-4613	2047	-4674	-3911	2658	-4413	117	-841	-4323	-4439	-4023	-4320	-3916	-2488	2176	-3342	-3040	27900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
164(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-4781	-4818	-5025	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2567	-2762	-3852	-4724	-4942	28000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
165(V)	-2623	-2122	-5301	-4990	-2770	-5102	-5132	2426	-4946	-1532	-1474	-4791	-4869	-4891	-5102	-4483	-2619	3200	-4506	-3990	28100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
166(H)	-495	-2631	903	-2051	722	-3242	3753	-2386	-2056	-2342	-1863	-2047	-3330	-1815	-2362	-2318	-2233	-2272	-981	3315	28200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
167(Q)	-4569	-4392	-3927	-4146	-5099	-4221	-4099	-5973	-3840	-5564	-5304	-4230	-4693	4575	-3826	-4704	-4772	-5612	-4577	-4751	28300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
168(D)	-2873	-4605	3943	-902	-4948	-2633	-2157	-5087	-2604	-4922	-4387	428	-3235	-1872	-3575	-2522	-3009	-4491	-4932	-3946	28400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
169(A)	1776	-1612	-1274	138	-1698	-2092	-816	-1295	150	-1526	-780	-943	1212	-538	-1013	-1056	-894	1275	-1968	635	28500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												

		Variante		SEQIDNO:					Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM																								
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento																				
170(S)	-1545	-2420	1001	-1518	-4049	-2206	-2206	-3839	-2264	-3938	-3103	-1627	-2814	-1909	-2758	2666	2313	-3045	-4143	-3560	28600%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
171(G)	-2999	-3461	-2978	-3207	-5161	3669	-3454	-5283	15	-5188	-4565	-3174	-3946	-3312	-3140	-3128	-3317	-4492	-4622	-4749	28700%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
172(N)	-877	-2349	-736	911	-2668	-1860	-518	-2415	711	-2363	-1440	1880	-1954	436	799	671	1230	-539	-2534	-1855	28800%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
173(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-4781	-4818	-5025	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2567	-2762	-3852	-4724	-4942	28900%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
174(K)	-1368	-2597	-1358	-720	-2953	-2298	1933	-2603	1975	851	-1706	-958	-2360	859	1012	-1273	1094	-2245	-2690	-2165	29000%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
175(D)	-27	-2613	-2320	1049	-2923	-1962	1973	-2684	544	-2624	-1712	1408	-2115	345	-869	-969	-1058	-2231	-2793	-2087	29100%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
176(V)	-1096	-938	-3279	-2658	-899	-2643	-1513	1265	1006	1388	-124	-2232	-2688	-1950	-2151	-1725	-311	1669	-1425	827	29200%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
177(A)	3342	-1826	-4064	-4295	-4368	111	-3651	-4129	-4159	-4412	-3484	-2820	-2903	-3689	-3929	-1469	409	-2949	-4599	-4508	29300%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
178(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	-4980	-4628	-1886	-5423	3316	-1236	-5514	-4997	-4750	-5002	-5379	-4399	-2629	-3665	-3690	29400%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
179(S)	2216	-1831	-3961	-4157	-4409	656	-3608	-4213	-4076	-4462	-3514	-2782	-2892	-3613	-3895	2686	-1675	-2982	-4623	-4523	29500%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
180(Y)	-3634	-3050	-4918	-4872	36	-4597	-1405	223	-4437	-250	-1998	-3545	-4494	-3522	-4004	-3782	-3536	-2621	2928	4349	29600%																				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249																					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																																
181(A)	3391	-1860	-3998	-4279	-4411	-2128	-3684	-	-4197	-4490	-	-	-2929	-3729	-3959	706	-1718	-	-4636	-	29700%																				

Variante				SEQIDNO:					Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM					
								4207			3565	2837						3001		4534		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
			C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
182(K)	370	307	113	-351	-2280	-1925	-615	324	1888	-2040	-1194	-632	-2022	-205	-736	1541	14	-1628	-2330	-1726	29800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
183(G)	2572	-2028	-3934	-4246	-4575	2752	-3783	-4406	-4316	-4661	-3751	-2958	-3070	-3837	-4092	-1679	-1898	-3191	-4701	-4686	29900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
184(I)	-2178	-1808	-4630	-4153	-2094	-4190	-3417	3121	-3909	311	-1023	698	-4099	-3656	-3864	-3388	-2148	1742	-3147	-2761	30000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
185(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	30100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
186(G)	1392	2751	-4353	-4536	-4308	2864	-3681	-4084	-4233	-4354	-3425	-2859	-2890	-3744	-3957	712	-1656	-2914	-4553	-4470	-30200%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
187(G)	855	-1822	-3738	-3769	-4188	2507	-3358	-3950	-3667	-4196	-3283	-2667	986	-3302	-3621	-1441	2334	-2867	-4408	-4236	30300%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
188(R)	-3706	-3692	-4490	-3846	1391	-4057	-2273	-3795	-1906	-3355	-3181	-3458	-4263	-2675	3948	-3768	-3671	-3813	-2293	-1328	30400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-155	-8139	-3345	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
189(A)	2844	-1670	-3814	-3873	-4048	-1958	-3316	-3787	-3686	-4061	-3156	-2598	-2734	-3301	-3572	1088	1907	-2713	-4286	-4136	30500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-7992	-9034	-894	-1115	-1303	-750	*	*													
190(G)	-4176	-3995	-4855	-5222	-5686	3828	-4823	-6386	-5533	-6087	-5741	-4896	-4606	-5312	-5178	-4461	-4560	-5613	-4754	-5635	30600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-7992	-9034	-894	-1115	-422	-1980	*	*													
191(V)	-2496	-2036	-5139	-4788	-2680	-4825	-4637	2522	-4686	-1549	-1431	-4527	-4668	-4584	-4783	-4148	629	2919	-4191	-3706	30700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
192(I)	-2760	-2307	-5270	-4785	1172	-4884	-3992	3346	-4576	662	-572	-4539	-4535	-4008	-4400	-4134	-2703	757	-3223	-3041	30800%	

			Variante			SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
193(E)	454	-3086	-801	3279	-4125	-2346	-1868	-3919	-18/68	-3932	-3156	-1291	1208	-1533	-2450	-1842	-2097	-3305	-4121	-3395	30900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
			C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
194(T)	-2738	-3109	-4509	-4810	-4918	-3305	-4346	-4865	-4769	-5072	-4551	-3987	-3998	-4580	-4545	-2999	4033	-4113	-4684	-4915	31000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
195(T)	-1323	-1975	-2766	-2978	-4207	-2152	-3105	-4004	-3295	-4229	-3354	134	-2901	-2988	-3387	-113	3742	-2969	-4405	-4119	31100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
196(F)	-4110	-3437	-5436	-5431	4216	-5143	-2159	-1742	-5074	563	-1124	-4290	-4871	-3987	-4561	-4547	-4016	-2374	-1356	-292	31200%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
197(K)	-111	-2844	-1470	1220	-3294	-2415	-860	-2939	2448	-2798	-1945	-1056	-2475	767	2054	-1421	-1432	-2544	-2858	-2356	31300%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
198(E)	545	-3735	1715	2880	-3981	-2308	-1442	-3818	-1408	-3725	-2924	-909	-2713	1281	-2087	-1777	-2041	-3331	-3909	-3046	31400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
199(E)	-4574	-4665	-2714	3919	-5655	-3995	-3886	-6219	-4238	-5898	-5604	-3415	-4513	-3838	-4570	-4456	-4726	-5786	-4878	-5197	31500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
200(T)	-1211	1331	-3446	-2962	-1399	-2495	-1930	-869	-2610	-1374	-769	-2403	-2815	-2309	-2526	-1685	3305	195	-1933	1430	31600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
201(E)	-1941	-3222	-921	3293	-3618	-2473	-1316	-3186	916	-3225	-2465	-1147	-2749	-923	-1064	-1790	-1902	-171	-3398	-2802	31700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
202(T)	-1286	-1898	-3764	-4016	-4329	-2157	-3572	-4120	-3959	-4408	-3517	-2789	-2947	-3588	-3797	697	3756	-2989	-4554	-4399	31800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
203(D)	-4580	-4701	4174	-3014	-5700	-3967	-3905	-6376	-4478	-6024	-5744	-3355	-4501	-3870	-4926	-4440	-4750	-5894	-4922	-5231	31900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		

Variante			SEQIDNO:							Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM											
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
204(L)	-3705	-3122	-6060	-5527	-1359	-5814	-4569	1065	-5292	3069	-146	-	5564	-4963	-4163	-4828	-	5215	-3571	-	1279	-3159	-	3298	32000%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
205(F)	-3777	-3220	-5271	-5259	4268	-4892	-2120	417	-4916	-1143	-	1314	-	4142	-4753	-3956	-4473	-	4270	-3740	-	1899	-1349	-269	32100%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento						
206(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-	6627	-5765	-6297	-	5970	-	5141	-4804	-5546	-5385	-	4727	-4815	-	5862	-4924	-	5849	32200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
207(E)	-4574	-4665	-2714	3919	-5655	-3995	-3886	-	6219	-4238	-5898	-	5604	-	3415	-4513	-3838	-4570	-	4456	-4726	-	5786	-4878	-	5197	32300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
208(Q)	-3157	-3746	-3170	-2450	-4497	-3515	-1763	-	4161	-443	-3809	-	3189	-	2392	-3620	4200	1284	-	3063	-2944	-	3900	-3556	-	3420	32400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
209(A)	2672	-1334	-3318	-2853	-1740	371	-2072	483	-2577	-1549	-928	-	2359	-2798	-2295	-2567	-	1629	191	932	-2245	-	1899	32500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
210(V)	-2620	-2125	-5293	-4983	-2756	-5076	-5100	1877	-4932	-1522	-	1466	-	4777	-4855	-4870	-5082	-	4456	-2619	3416	-4480	-	3969	32600%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
211(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	-4980	-4628	-	1886	-5423	3316	-	1236	-	5514	-4997	-4750	-5002	-	5379	-4399	-	2629	-3665	-	3690	32700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
212(C)	-2243	5044	-4840	-4445	-1998	-3905	-3598	-31	-4138	449-	-930	-	3902	-4040	-3778	-4010	-	3184	-2306	1347	-3209	-	2883	32800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
213(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-	6627	-5765	-6297	-	5970	-	5141	-4804	-5546	-5385	-	4727	-4815	-	5862	-4924	-	5849	32900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
214(G)	677	-2128	-3838	-4171	-4647	3536	-3816	-	4506	-4340	-4749	-	3857	-	3009	-3149	-3871	-4137	-	1784	-2005	-	3297	-4725	-	4735	33000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		

311/323

Variante			SEQIDNO:					Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM								
215(V)	378	724	-3707	-3104	-1180	-2986	-1919	1210	-2734	1302	-359	-2627	-3014	-2382	-2566	-2089	1123	1949	-1773	-1423	33100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
216(M)	-948	-1407	-1515	156	-1452	-2164	1677	-1030	-821	-1302	1976	-1113	-2245	-718	-1173	773	1715	1332	-1794	-1343	33200%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
217(E)	1397	-2528	-725	2286	-2932	240	-791	-2681	328	-2645	-1744	-674	-2162	-351	-939	545	-1095	-2227	-2828	-2143	33300%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
			C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
218(L)	-3705	-3122	-6060	-5527	-1359	-5814	-4569	1065	-5292	3069	-146	-5564	-4963	-4163	-4828	-5215	-3571	-1279	-3159	-3298	33400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
219(V)	-2600	-2108	-5251	-4894	-2568	-5025	-4783	2479	-4810	-1354	1358	-4863	-4772	-4654	-4895	-4362	-2584	3018	-4181	-3758	33500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
220(K)	-1633	-2905	-1573	706	-3375	-2487	-900	-3003	2925	-2849	-2008	-1128	-2541	1714	784	-1509	-105	-2617	-2894	-2418	33600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
221(A)	2352	2066	-2593	-2000	-947	-2434	-1271	-486	-32	-832	714	-1817	-2498	-1493	-1792	-1483	274	453	-1419	501	33700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
222(G)	224	-1905	-3562	-3696	-3684	3361	-3297	-3220	-3625	81	-2886	-2733	-2977	-3326	-3545	-1606	-1763	-2574	-4068	-3810	33800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
223(F)	-4781	-3756	-5207	-5542	4341	-5070	-1342	-3653	-5111	-2971	-3065	-3743	-4949	-3874	-4496	-4351	-4650	-3829	-591	1725	33900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
224(E)	-2413	-4114	551	3465	-4392	-2485	-1689	-4248	-1608	-4112	-3396	-1094	-2951	-1336	871	-2119	-2441	-3763	-4239	-3395	34000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
225(T)	-1461	-1864	-3139	-2645	-2659	-2483	-2136	-1734	-1646	-2359	-1761	-2298	-2936	-1995	920	-1748	3354	967	-2989	-2654	34100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													

	Variante			SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM					
226(L)	-3831	-3266	-5314	-5148	-673	-5068	-2476	-	-4706	3059	-789	-	-4756	-3864	-4314	-	-3729	-	-1672	1736	34200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
227(V)	-1819	-1960	-4426	-4359	-2977	-3037	-3800	-439	-4098	-2145	-	-	-3600	-3879	-4011	-	2510	2999	-3974	-	34300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
228(E)	-2863	-4790	1397	3563	-4990	-2594	-2061	-	-2476	-4848	-	-	-3182	-1761	-3454	-	-2968	-	-4951	-	34400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
229(A)	2686	-1916	-1440	275	-2529	-292	-1240	-	-998	-2345	1183	-	-2355	-905	-1425	512	-1158	-	-2697	-	34500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
230(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-	-5765	-6297	-	-	-4804	-5546	-5385	-	-4815	-	-4924	-	34600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
231(Y)	-4099	-3483	-4921	-5048	-109	-4705	-1565	-	-4494	-2334	2010	-	-4707	-3735	-4111	-	-4068	-	-847	4618	34700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
232(Q)	1711	-2410	-772	934	-2739	-1925	-604	-	-171	-2433	-	-574	-2035	2086	345	902	-923	-	-2608	-	34800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
233(P)	-3403	-4071	-1922	817	-5220	-3359	-3173	-	-3337	-5281	-	-	4045	-2989	-3760	-	-3624	-	-4763	-	34900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
234(E)	-2870	-4786	1265	3587	-4993	-2600	-2068	-	-2483	-4852	-	-	-3188	-1768	-3458	-	-2974	-	-4950	-	35000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
235(M)	-3089	-2618	-5526	-4976	-1443	-5128	-4045	653	-4735	1429	4269	-	-4610	-3915	-4423	-	-2995	1140	-3054	-	35100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
236(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-	-4818	-5025	-	-	-3728	-4477	-4545	-	-2762	-	-4724	-	35200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
237(Y)	-4797	-3764	-5203	-5543	1114	-	-1339	-	-5111	-3013	-	-	-4951	-3876	-4497	-	-4666	-	-588	4723	35300%

Variante				SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM						
						5069*		3694			3107	3741				4354		3859				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
238(F)	-3828	-3605	-4146	-4086	4292	-4207	-2060	-3492	774	-3071	-3005	-3556	-4434	-3287	-2952	-3868	-3858	-3571	-1593	-494	35400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
239(E)	-2775	-4471	-511	3582	-4815	-2610	-2057	-4863	-2317	-4711	-4124	1234	-3182	-1755	-3103	-2442	-2884	-4306	-4753	-3820	35500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
240(C)	-1407	5023	-4397	-4323	-3016	-2468	-3398	-1251	-3952	-2540	-2082	-3044	-3133	-3588	-3744	-1803	1473	1125	-3677	-3390	35600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
241(L)	-3370	-2847	-5795	-5233	-1386	-5465	-4298	708	-5010	2859	1349	-5155	-4777	-4026	-4622	-4755	-3254	814	-3103	-3213	35700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
			C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
242(H)	-2519	-4224	-445	946	-4287	-2505	4583	-4377	-1764	-4237	-3571	2007	-3009	-1439	-2361	-2209	-2569	-3893	-4267	-3353	35800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
243(E)	-3177	2571	-2701	3711	-4851	-3438	-3479	-4765	-3558	-4932	-4406	-3081	-4005	-3370	-3802	-3269	-3451	-4260	-4554	-4524	35900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
244(L)	-85	-1333	-3893	-3280	-1111	-3185	-2083	1066	-2910	2310	1961	-2823	-3170	-2501	-2721	-2289	-113	436	-1859	-1558	36000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
245(K)	-2513	-3173	-2941	-2370	-4402	-3094	-1824	-3895	3666	-3734	-3068	-2271	-3377	-1447	-616	-2537	751	-3485	-3625	-3471	36100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
246(L)	-3571	-3023	-5954	-5375	-1321	-5646	-4390	-532	-5138	2962	1671	-5358	-4852	-4044	-4689	-4963	-3436	742	-3082	-3239	36300%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
247(I)	-2980	-2484	-5473	-5109	-1958	-5196	-4587	3728	-4915	267	-781	-4933	-4833	-4427	-4799	-4598	-2949	-64	-3627	-3397	36400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
248(V)	-1685	-1668	-4095	-3732	-2081	-3082	2893	-227	-3402	-1488	1383	-3123	-3419	-3145	-3320	367	-1807	3332	-2874	-2504	38500%	



Variante				SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
249(D)	-2963	-4569	3864	-1039	-4953	-2751	-2187	-4998	767	-4822	-4260	-1424	-3314	-1891	-3072	-2624	-3060	-4467	-4770	-3962	36600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
250(L)	-2768	-2715	-4842	-4633	-1675	-3998	-3790	-1038	-4207	3056	-562	-4150	-4179	-3740	-3969	-3399	699	-1545	-3154	-3067	36700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
251(M)	-2822	-2356	-5342	-4861	-1759	-4985	-4151	2587	-4663	173	4005	-4649	-4501	-4076	-4487	-4251	-2764	766	-3321	-3210	36800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
252(Y)	-4562	-3630	-5142	-5401	1516	-4992	-1300	-3544	-4968	-2963	-2986	-3671	-4868	-3786	-4393	381	-4432	-3662	2413	4375	36900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
253(E)	-1959	-3457	-568	3135	-3841	-2347	-1410	-3622	-1165	-3547	-2751	-1000	-2716	1879	-1666	-1757	692	-3162	-3709	-2960	37000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
254(G)	-347	-2818	-1215	201	-3253	2635	-921	-2921	1474	-2822	-1972	-1002	-2459	-486	658	-1397	-1435	-2521	-2923	-2378	37100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
255(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	37200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
256(I)	-2042	-1768	-4321	-3740	-1316	-3753	-2668	3134	-3389	1017	1999	194	-3653	-2958	-3221	-2884	-1980	-344	-2325	-2073	37300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
257(A)	1914	-1640	-1237	128	-1748	-661	-793	-1355	-577	-49	-817	-905	-2155	-498	-993	1037	162	-1149	-2002	624	37400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
258(N)	365	-3809	1001	557	-4083	1196	-1518	-3930	-1535	-3838	-3055	3219	-2763	-1148	-2243	-1845	-2131	-3433	-4027	-3144	37500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
259(M)	-3656	-3159	-5816	-5350	-1349	-5421	-4248	-822	-4928	948	-4920	-5248	-4838	-4039	-4539	-4860	-3558	-1557	-3044	-3030	37600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

Variante			SEQIDNO:						Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
260(R)	-1614	-1949	-2260	-1663	-886	-2765	-1089	-1596	-1089	360	-1133	2239	-2814	-1215	2406	-1789	-1535	-1468	1995	1546	37700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
261(Y)	-1548	-2973	568	-509	-2846	-2207	1172	-2996	441	-2941	-2110	1645	-2446	-659	-1264	-1389	-1509	-2582	-2924	3695	37800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
262(S)	279	-1844	-3877	-4131	-4448	136	-3634	-4260	-4132	-4511	-3561	-2782	-2903	-3648	-3936	3391	-1692	-3009	-4661	-4566	37900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
263(I)	279	-1844	-3877	-4131	-4448	136	-3634	-4260	-4132	-4511	-3561	-2782	-2903	-3648	-3936	3391	-1692	-3009	-4661	-4566	38000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
264(S)	-2212	-2711	-4019	-4348	-4697	-2899	-47045	-4988	-4527	-5102	-4364	-3492	-3638	-4203	-4355	3681	-2664	-3902	-4616	-4605	38100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
265(N)	-2725	-4778	2906	990	-4896	-2486	-1922	-4885	-2320	-4718	-4140	3035	-3069	-1612	-3311	-2334	-2621	-4325	-4919	-3794	38200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento	
266(T)	-2061	-3396	-596	903	-4071	-2367	-1713	-3874	-1685	-3859	-3103	2125	-2850	-1369	-2277	-1897	3157	-3351	-4055	-3271	38300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
267(A)	3410	-2035	-3979	-4290	-4573	659	-3798	-4400	-4332	-4660	-3754	-2978	-3080	-3858	-4099	-1690	-1908	-3194	-4697	-4687	38400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
268(E)	-2118	-3486	-1036	2964	-3935	-2588	-1284	-3596	1878	-3417	-2636	-1209	-2827	1323	-773	-1923	-2032	-3199	-3455	-2917	38500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
269(Y)	-4524	-3618	-5100	-5310	1910	-4972	-1299	-3522	634	-2951	-2965	-3649	-4847	-3741	-4299	-4199	-4391	-3637	2997	4211	38600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-155	-8139	-3345	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
270(G)	-4176	-3995	-4855	-5222	-5686	3828	-4823	-6386	-5533	-6087	-5741	-4896	-4606	-5312	-5178	-4461	-45610	-5613	-4754	-5635	38700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												

Variante			SEQIDNO:				Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM								
271(D)	-2710	-4705	3025	1828	-4880	1758	-1932	-4863	-2320	-4703	-4115	-1084	-3073	-1621	-3297	-2330	-2809	-4301	-4894	-3793	38800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
272(Y)	-2497	-2175	-4651	-4317	2447	-40476	-2215	255	-3766	892	1558	-3537	-3886	-3109	-3468	-3181	-2410	-1282	-1615	3508	38900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
273(V)	-1425	-1250	-3480	-2894	-1283	-3035	-1955	691	-2570	-1	-429	-2568	-3060	942	-2514	-2129	1701	2578	-1907	-1553	39000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
274(T)	516	-1643	-1918	-1401	-2170	-2112	-1387	-1759	-1234	-2016	-1265	-1422	-2421	-1149	887	1341	2345	822	-2454	-2006	39100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
275(G)	677	-2128	-3838	-4171	-4647	3536	-3816	-4506	-4340	-4749	-3857	-3009	-3149	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	-4725	-4735	39200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
276(P)	-992	-2210	343	-359	-2447	-1960	-675	-2143	533	-2204	-1351	-651	2813	-260	-802	465	-939	-873	-2467	1093	39300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
277(R)	-1214	-2548	-1097	1072	175	-2145	-716	-2587	848	-2528	-1653	-795	-2228	-273	2862	417	-1133	-2191	-2671	-2084	39400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento	
278(V)	289	-20358	-5133	-4789	-2692	-4777	-4639	2142	-4689	-1561	-1443	-4511	-4649	-4585	-4784	-4102	-2487	3125	-4202	-3717	39500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
279(I)	-2265	-1919	-4828	-4452	-2473	-4254	-3954	3155	-4265	-1516	-1326	-4066	-4279	-4082	-4274	226	-2288	2182	-3688	-3250	39600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
280(D)	-1731	-3162	2329	-550	-3318	-2239	-1273	-3221	-1145	-3214	-2403	2295	-2573	-899	-1742	-1561	1851	-2804	-3366	1327	39700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
281(E)	1097	-2699	1227	2368	-2994	-2011	-796	-2753	381	-2704	-1808	-640	-2190	-358	-992	-1065	-1162	-2310	-2885	1152	39800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												

	Variante			SEQIDNO:				Passagem			Horas				Titulação de isobutanol, mM						
282(E)	-166	-2372	859	1835	-2692	-1861	1182	-2444	490	-2388	-1462	590	478	1356	-620	116	-837	-1994	-2555	-1871	39900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
283(T)	228	-1688	-3655	-3444	-3179	-2145	-2891	-2611	-3215	-3076	-2328	-2557	-2821	-2916	-3214	2251	2366	1397	-3549	-3270	40000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
284(K)	-2991	-3623	-3848	-2331	-4472	-3512	-1356	-3769	2942	-3413	1860	-2188	-3430	-937	2705	-2874	-2650	-3556	-3267	-3189	40100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
285(E)	443	-2370	732	1690	-2691	-1863	-526	-2442	1639	-2385	-1460	-498	-1960	1120	437	106	-836	-1992	-2552	-1869	40200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
286(A)	1871	-2286	-843	814	-2570	-1928	-578	269	1096	-2279	-1391	-586	-2019	-136	1056	-62	-881	-1889	-2488	-1849	40300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
287(M)	-3656	-3159	-5816	-5350	-1349	-5421	-4248	-822	-4928	948	4920	-5248	-4838	-4039	-4539	-4860	-3558	-1557	-3044	-3030	40400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
288(K)	-1646	-2891	-1591	287	-3346	-526	-912	-2971	2831	-2832	-1997	-1146	-2554	-472	1762	-1527	-1524	-2597	-2885	1245	40500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
289(E)	-172	-2394	367	2205	-2713	-487	-545	-2465	-134	-2409	-1485	1305	-1975	663	831	-795	72	-2015	-2577	-1891	40600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
290(C)	1574	3024	-5695	-4122	-2155	-3932	-3330	1746	-3870	-1406	-1109	-3691	-3957	-3613	-38058	-3144	-2046	2342	-3118	-2720	40700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
291(L)	-187	-2175	-4307	-3889	-898	-3779	-2344	-944	-3485	2855	-476	-3390	-3782	-3025	-3298	-2972	-2345	-1269	-1846	1565	40800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
292(K)	862	-2347	143	1211	-2665	-1855	873	-2414	1692	-2362	917	-492	-1949	8/89	-603	-763	783	-1968	-2532	-1851	40900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
293(D)	-2148	-3878	2790	1765	-4119	-2356	-1511	-	-1467	-3852	-	24	-2782	-1139	2142	-	-2163	-	-4024	-	41000%

Variante				SEQIDNO:					Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM					
								3962				3075					1879		3473		3155	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
294(I)	-2630	-2131	-5302	-4991	-2737	-5092	-5106	3464	-4941	-1495	-1447	-4789	-4862	-4869	-5086	-4473	-2627	2071	-4467	-3968	41100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
295(Q)	346	-3134	-1818	-1401	-3862	-2760	-1314	-3433	1329	-3271	-2513	-1545	-2936	3817	-430	-2018	-2031	-3060	-3278	-2908	41200%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
296(S)	-1354	-2895	1712	354	-3192	-2068	-914	-2967	-621	-2903	-2012	1817	-2268	724	-1177	1978	-96	-2508	-3076	-2340	41300%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
297(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4294	-5849	41400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
298(E)	-437	-2374	-769	2013	-2697	-1895	-552	-2438	623	-2389	-1472	-536	-1991	-97	777	829	1488	-1999	-2559	-1890	41500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
299(F)	-4347	-3577	-4619	-543	3858	-4820	-1320	-3438	-4609	-2900	-2894	-3532	-4750	-3628	-4209	-4078	-4237	-3546	-601	2917	41600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
300(A)	2827	-1603	-4068	-3628	-2047	-3165	-2823	1205	-3349	-1486	-1089	-3103	-3432	-3073	-3298	-2387	197	1100	-2812	-2447	41700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
301(K)	-2364	-3363	-2464	163	-4038	-3041	-1188	-3501	2928	-3234	-2487	-1693	-3047	-758	2488	-458	-2152	-3194	-3159	-2895	41800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
			C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
302(M)	-893	-2361	740	1780	-2680	-537	-524	-2429	930	-2376	1895	-498	-1958	-66	722	775	-833	-1982	-2545	-1864	41900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
303(W)	-2965	-2553	-4795	-4482	3045	-4315	-1779	-1426	-4093	92	-987	-3564	-4179	-3330	-3743	-3475	-2878	664	4754	-84	42000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*													
304(I)	-2621	-2136	-5246	-4859	-2364	-4987	-4577	3052	-4747	-250	1043	-4641	-4713	-4488	-4769	-4301	-2597	2384	-3934	-3596	42100%	

Variante				SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
305(L)	684	-1319	-1741	761	-1375	-2223	-1037	-927	-1042	1693	-533	-1287	-2325	-915	-1349	767	-152	84	-1756	-1329	42200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
306(E)	364	-4165	621	3314	-4393	-2398	-1686	-4282	-1836	-4169	-3446	728	-2893	-1339	-2626	-2045	-2402	-3767	-4362	-3401	42300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
307(N)	-939	979	-1235	-681	-1738	1352	935	-1357	-549	-1572	-816	2186	-2155	-482	165	-1022	-880	30	-1990	1446	42400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
308(Q)	667	-2393	-773	511	-272	-316	-544	-2465	1211	-2405	-1484	584	-1989	2135	1528	-812	-868	-2019	-2566	-1895	42500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
309(A)	2050	-1857	-1081	-526	-2013	-2012	188	-1645	-385	-1213	-1011	486	-2103	-3476	1657	-953	306	-261	-2169	-1624	42600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
310(G)	-1848	-2469	-2089	-2292	1262	2944	-2358	-3563	-2904	-3628	-3017	234	-3167	-2550	-3185	-1986	-2162	-3009	-2814	-1874	42700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
311(Y)	475	1019	-1606	-1042	225	-2192	-935	-946	-891	-1226	1222	357	-2267	1002	1577	-1172	-888	-800	-1730	2246	42800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
312(P)	-87	-2372	-1362	756	-3738	-2205	-2007	-3445	-1924	-3575	-2761	-1555	3598	-1697	-2362	-1566	286	-2803	-3832	-3277	42900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
313(K)	-804	-1483	-564	-230	-1920	-1335	-101	-1605	2889	-1630	-1021	-349	-1569	232	698	-786	-759	-1358	-1637	-1317	43000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*												
	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento	
314(E)	-766	-1695	521	2831	-2050	-1029	-293	-1804	-118	-1919	-1331	69	-1441	-4	-527	-653	-814	-1512	-1988	-1505	43100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-109	-3775	*	*												
315(T)	-942	-2382	-739	1086	-2714	151	-581	-2459	-171	-2415	-1499	414	-2004	-128	839	1365	1730	-2017	-2592	-1915	43200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

Variante			SEQIDNO:						Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
316(M)	-2196	-1920	-4499	-3891	1726	-3822	-2504	-645	-3523	1973	3030	-3442	-3673	-2938	-3257	-2944	-2114	326	-2014	1662	43300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
317(H)	-883	-2314	-747	517	-2618	-1863	1714	-647	1272	-2322	-1408	1011	472	-69	433	-772	1411	-299	-2507	-1836	43400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
318(A)	2474	-2397	-816	-367	-2797	-273	-722	-2529	555	-2507	-1610	592	-2110	837	-805	-138	-1006	-2092	-2699	-2039	43500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
319(M)	-154	-986	-2485	-337	1024	-375	-1232	325	-444	867	1235	-1752	-2474	-1419	1020	-1455	670	-411	831	535	43600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
320(R)	-1311	-2432	-1349	-724	-2724	-2272	-799	-2361	613	-644	1079	976	597	-382	2908	-1246	-1219	-2044	-2579	-2061	43700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
321(R)	897	-2364	-833	905	-2678	-1930	-568	-2405	1293	-2366	1485	-575	-2020	-117	2045	95	-893	-1984	-2543	-1892	43800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
322(N)	505	-2300	-750	523	-2598	121	-525	-594	485	95	-1395	1720	-1957	348	224	551	-821	-1910	-2497	-1828	43900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
323(E)	444	-2266	-766	1488	-2551	-1871	-533	-2276	889	-2266	1474	1478	-1963	682	-629	-781	12	-279	-2472	476	44000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
324(N)	1511	-1770	-728	-204	-2244	-1781	-426	282	601	-2121	-1133	1769	-1827	1398	447	-748	-766	-1713	-1779	-1595	44100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
325(N)	1053	-3109	1756	1735	-3404	-2143	-1074	-3191	-846	-3124	-2254	2158	-2417	-657	-1430	-1361	197	-2727	-3303	-2540	44200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
326(H)	-2064	-3071	-1245	-1267	-3262	-2570	4711	-3611	-1060	-3528	-2812	-1479	-2961	1288	-1287	670	-2133	-3161	-3310	-2601	44300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												

Variante		SEQIDNO:							Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM				
327(Q)	-891	-2294	332	948	-2585	-739	-537	-	-131	-138	-	-518	1404	2021	-634	-785	619	-561	-2495	-	44400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
328(I)	-1632	-1661	-2846	-86	-1626	-2983	-1663	3240	-1327	-191	-722	-	-3016	-1615	822	-	-1556	-560	-2157	-	44500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
329(E)	-2734	-3605	-1382	3593	-3624	-2986	-2317	-	-2175	-3167	1983	-	-3440	-2054	-2556	-	-2820	-	-3920	-	44600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
330(W)	-1530	-1265	-2068	-1964	479	-1810	-483	-	-1470	-968	-802	-	-2104	-1454	-1405	-	-1583	-	5462	838	44700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-109	-3775	*	*												
331(K)	8	-2067	-905	437	-2275	-1941	-611	-307	2031	-2031	-	-636	-2030	1425	-709	-864	-350	1337	-2323	-	44800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
332(V)	-2445	-2012	-5067	-4708	-2628	-4682	-4459	1586	-4580	-1533	-	-	-4575	-4456	-4653	-	1117	3227	-4065	-	44900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
333(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-	-5765	-6297	-	-	-480	-5546	-5385	-	-4815	-	-4924	-	45000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
334(E)	1477	-2744	-762	2410	-3114	-2113	-884	-	-445	-2492	-	619	-2297	-451	1346	-	-1280	-	-2952	-	45100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
335(K)	-1204	-2643	366	1309	-2998	-2086	-724	-	2626	-2637	-	-718	-2200	1198	862	-	-1133	-	-2770	-	45200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
336(L)	-3571	-3023	-5954	-5375	-1321	-5646	-4390	-632	-5138	2962	1671	-	-4852	-4044	-4689	-	-3436	742	-3082	-	45300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
337(R)	-4845	-4446	-5107	-4682	-5507	-4412	-3791	-	-2789	-5502	-	-	-4754	-3672	4219	-989	-4832	-	-4538	-	45400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento	



Variante				SEQIDNO:				Passagem				Horas				Titulação de isobutanol, mM				
338(L)	943	-2422	1002	1200	-2741	377	-572	-	982	-2439	-	-522	-1998	-117	-681	1129	-534	-	-	45500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*											
339(M)	-3391	-2886	-5774	-5202	-1338	-5407	-4210	-576	-4943	1721	4369	-	-4742	-3963	-4548	-	-3273	771	-3038	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*											
340(M)	-1812	-1601	-3997	-3375	696	-3401	-2222	-516	-2983	441	4360	-	-3334	-2559	641	-	-3273	771	-3038	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*											
341(P)	102	-1789	-1729	-1313	428	-2112	-1410	-	-1236	-2235	-	-	3205	695	-1607	703	-1207	-	-2613	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-259	-8139	-2637	-894	-1115	-701	-1378	*	*											
342(W)	-3486	-3022	-4312	-4121	1891	-4228	-1173	-	310	-2389	-	-	-4206	-2971	-3005	-	-3396	-	5644	611
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-239	-7889	-2749	-894	-1115	-1590	-583	*	*											
343(I)	-2220	-1737	-4860	-4531	-2271	-4617	-4497	3348	-4448	-1059	-	-	-4407	-4340	-4559	-	-2216	2150	-3915	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-114	-7660	-3820	-894	-1115	-1149	-865	*	*											
344(A)	1699	-2218	532	-33	-2555	-553	-413	-	1212	-2260	-	582	-1822	37	-536	966	-724	-	-2439	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-10	-7753	-8795	-894	-1115	-897	-1111	*	*											
345(A)	1523	-2068	-769	-231	-2383	1040	-522	-	928	-2120	-	-517	-1922	1335	-611	251	-768	-123	-2361	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-9	-7949	-8991	-894	-1115	-1432	-668	*	*											
346(N)	-1650	-3264	1760	-348	-3555	-23	-1131	-	324	-3285	-	2847	1624	-733	-1607	-	-1645	-	-3466	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-193	-7842	-3049	-894	-1115	-1432	-668	*	*											
347(K)	150	-2932	-2433	-1483	-3710	-2747	-907	-	3369	-2897	-	-	-2774	-488	1175	-	-1888	-	-2822	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-11	-7660	-8702	-894	-1115	-1824	-479	*	*											
348(L)	-740	-922	-1768	154	-921	-2070	-829	1384	247	1472	-100	-	-2134	-805	485	-	-677	471	-1340	-944
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249
-	-11	-7660	-8702	-894	-1115	-943	-1059	*	*											
349(V)	138	-1046	-3186	-2599	-1089	-2803	-1711	589	645	945	-236	-	-2830	-2012	-2236	-	-1154	2537	-1701	-
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249

Variante			SEQIDNO:						Passagem			Horas			Titulação de isobutanol, mM						
-	-9	-7842	-8885	-894	-1115	-380	-2109	*	*												
		C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Posição em alinhamento
350(D)	-2086	-3722	2888	1158	-4001	1601	-1510	-3811	-1573	-3773	-3018	-904	-2733	-1154	-2294	-1833	-2125	575	-3993	-3117	46700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8046	-9088	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
351(K)	-78-	2308	398	-137	-2626	-483	542	-2374	2441	-2323	-1400	-447	531	720	-562	-724	290	-1929	-2493	-1812	46800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8046	-9088	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
352(D)	898	-1911	1604	-335	-2089	-1892	-573	-1746	489	-144	811	-609	347	-182	-708	541	-74	-281	-2188	-1605	46900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-10	-7745	-8787	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
353(K)	-1676	-2544	-1956	-1135	-2823	-2531	-800	-2469	2955	-2426	-1683	-1240	-2548	-407	1469	-1628	-1517	-119	-2497	1619	47000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-11	-7649	-8691	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
354(N)	-1074	-1925	-1092	-1190	-3523	-1781	-1760	-3345	-1701	-3432	-2589	3429	1327	-1460	-2119	1182	-1362	-2558	-3601	-3046	47100%
-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
-	*	*	*	*	*	*	*	*	0												

### **REIVINDICAÇÕES**

1. CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, caracterizada por compreender uma via projetada de produção de isobutanol e pelo menos um dentre:

i) um polipeptídeo heterólogo com atividade de cetol-ácido redutoisomerase (KARI) selecionado a partir do grupo que consiste em:

1. um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 90% de identidade com uma enzima KARI derivada de *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium beijerinckii* ou *Anaerostipes caccae* ou um fragmento ativo do mesmo;

2. um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade com a SEQ ID NO: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 ou 65; ou

ii) um polinucleotídeo heterólogo que codifica o polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI de i).

2. CÉLULA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI ter pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95% de identidade com a SEQ ID NO: 27, 29, 141, 143, 275 ou 277.

3. CÉLULA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 2, caracterizada pelo polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI compreender substituições nos aminoácidos que correspondem a S56 e S58 da SEQ ID NO: 27; ou

pelo polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI compreender substituições nos aminoácidos que correspondem a S56 e S58 da SEQ ID NO: 27 e uma substituição de um ou mais dos aminoácidos que correspondem a I86, N87, T131 ou T191 da SEQ ID NO: 27; ou

pelo polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI compreender

uma substituição de aminoácido em uma ou mais das posições que correspondem aos aminoácidos A41, S56, S58, I87, T131, T191, R227 ou Q246 da SEQ ID NO: 27.

4. CÉLULA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada por ter uma produtividade de isobutanol eficaz de pelo menos cerca de 3, pelo menos cerca de 4 ou pelo menos cerca de 5 gramas por grama de células após cerca de 48 horas, em que pelo menos as últimas cerca de 24 das 48 horas estão sob condições anaeróbias.

5. CÉLULA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI ter um  $K_M$  para NADH menor que cerca de 350, menor que cerca de 100, menor que cerca de 50 ou menor que cerca de 10  $\mu M$  em pH 6,8.

6. CÉLULA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada por ser uma célula hospedeira de levedura selecionada a partir de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Issatchenkia* ou *Pichia*, preferencialmente *Saccharomyces cerevisiae*.

7. CÉLULA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pela via projetada de produção de isobutanol compreender as seguintes conversões de substrato em produto:

- a) piruvato em acetolactato
- b) acetolactato em 2,3-diidroxiisovalerato
- c) 2,3-diidroxiisovalerato em 2-cetoisovalerato
- d) 2-cetoisovalerato em isobutiraldeído; e
- e) isobutiraldeído em isobutanol;

em que cada uma das conversões de substrato em produto é catalisada por uma enzima que é expressa de modo recombinante pela célula hospedeira.

8. CÉLULA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por todas as conversões de substrato em produto serem catalisadas por enzimas heterólogas à célula hospedeira; ou

por pelo menos um polinucleotídeo heterólogo que codifica pelo menos uma das enzimas heterólogas à célula hospedeira estar integrado de modo cromossômico na célula hospedeira; ou

pelas conversões de substrato em produto serem catalisadas por enzimas substancialmente localizadas no citosol; ou

pela conversão de substrato em produto de isobutiraldeído em isobutanol ser catalisada por uma enzima álcool desidrogenase que utiliza NADH como um cofator.

9. CÉLULA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada por compreender ainda capacidade reduzida, interrompida ou eliminada de converter acetolactato em 2,3-diidroxi-2-metilbutirato; ou

por ter expressão ou atividade de piruvato descarboxilase reduzida, interrompida ou eliminada, preferencialmente atividade de PDC1, PDC5 ou PDC6 reduzida, interrompida ou eliminada ou uma combinação das mesmas; ou

por ter expressão ou atividade de glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD reduzida ou eliminada; ou

por ter expressão ou atividade de FRA2 reduzida ou eliminada; ou combinações das mesmas.

10. CÉLULA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada por produzir isobutanol sob condições anaeróbicas e em que a razão molar de isobutanol para glicerol é maior que 1.

11. MÉTODO PARA PRODUZIR ISOBUTANOL, caracterizado por compreender:

a) fornecer uma célula hospedeira recombinante, conforme definida em uma das reivindicações 1 a 10; e

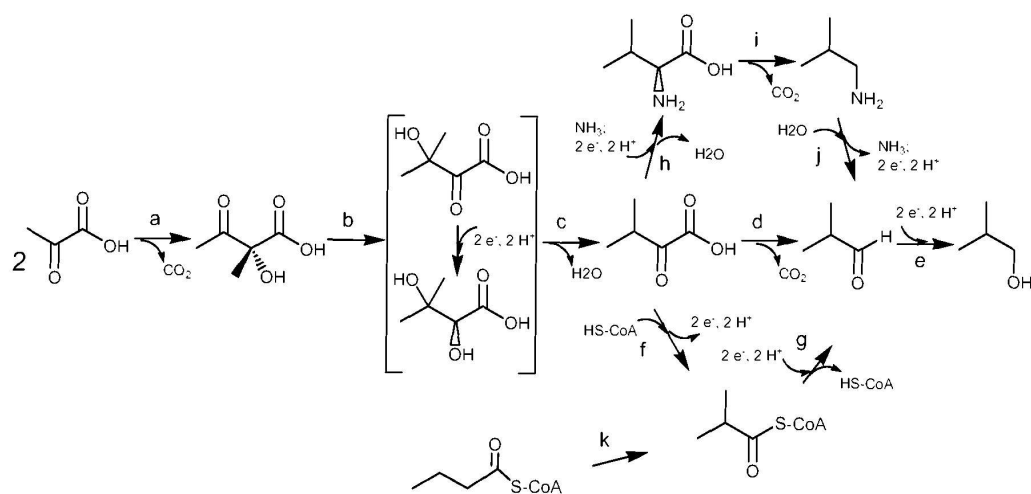
b) contatar a célula hospedeira de a) com um substrato de carbono sob condições nas quais o isobutanol é produzido.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por pelo menos uma porção do contato ocorrer sob condições anaeróbicas; ou pelo contato ocorrer na presença de um extratante; ou pelo contato ocorrer na presença de uma quantidade suficiente de extratante orgânico para formar um sistema bifásico que compreende uma fase aquosa e uma fase orgânica.

13. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 11 a 12, caracterizado por um ou mais dentre a taxa eficaz, titulação eficaz ou rendimento eficaz de isobutanol estar aumentado em comparação a uma célula hospedeira recombinante que não compreende pelo menos um dentre um polipeptídeo heterólogo com atividade de KARI ou um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo com atividade de KARI.

14. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pela razão molar de isobutanol para glicerol ser maior que 1.

15. POLIPEPTÍDEO, caracterizado por compreender pelo menos cerca de 90% de identidade ou pelo menos cerca de 95% de identidade ou pelo menos cerca de 99% de identidade com a SEQ ID NO: 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 417, 419, 421, 423, 425, 427, 429, 431, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 624, 626, 628, 630, 632 ou um fragmento ativo das mesmas, em que o dito polipeptídeo tem atividade de cetol-ácido redutoisomerase.

**Fig. 1**

**Fig. 2**

K9	(1)	MEECKMAKIYYQEDCNLSLLDGKTIAVIG <b>Y</b> GSQGHAA <b>L</b> NAKESGCNVII
PF5	(1)	-----MKVFYDKDCDLSIIQKKVAII <b>Y</b> GSQGHAA <b>C</b> NLKDSGVDVTV
K9	(51)	GLYEGSKSWKRAEEQ <b>F</b> EVYTAAEAAKKADIIMIL <b>I</b> NDEKQATMYKNDIE
PF5	(45)	GLRKGSA TVAKAEAHG <b>L</b> KVTDVAAAVAGADLVMIIL <b>T</b> PDEFQSQLYKNEIE
K9	(101)	PNLEAGNMLMEAHGFIHFGCI VPPKDVDTMIAPKGP GHTVRS EYEEGK
PF5	(95)	PNIKKGATLAFSHGFAIHYNQVVPRADLDVIMIA PKAPGHTVRS EYVKGG
K9	(151)	GVPCLVAVEQD <b>A</b> TGKALDMALAYAL <b>A</b> IGGARAGVLETFRTETETDLFGE
PF5	(145)	GIPDLIAIYQD <b>A</b> SGNAKNVALSYAA <b>G</b> VGGGRTGIIETTFKDETETDLFGE
K9	(201)	QAVLCGGVCALMQAGFETLVEAGYDPRNAYFECIHEMKLIVDLIYQSGFS
PF5	(195)	QAVLCGGTVELVKAGFETLVEAGYAPEMAYFECLELKLIVDLIMYEGGIA
K9	(251)	GMRYISISNTAEYGDYITGPKIITEDTKKAMKKILSDIQDGTFAKDFLVDM
PF5	(245)	NMYSISNNAEYGEYVTGPEVINAESRQAMRNALKRIQDGEYAKMFISEG
K9	(301)	SDAGSQVHFKA MRKLA SEHPAEVVGEEIRSLYSWSEDEKLINN---
PF5	(295)	--ATGYPSMTAKRRRNAAHGIEIIIGEQLRSMPWPWIGANKIVDKAKN



Fig. 3A

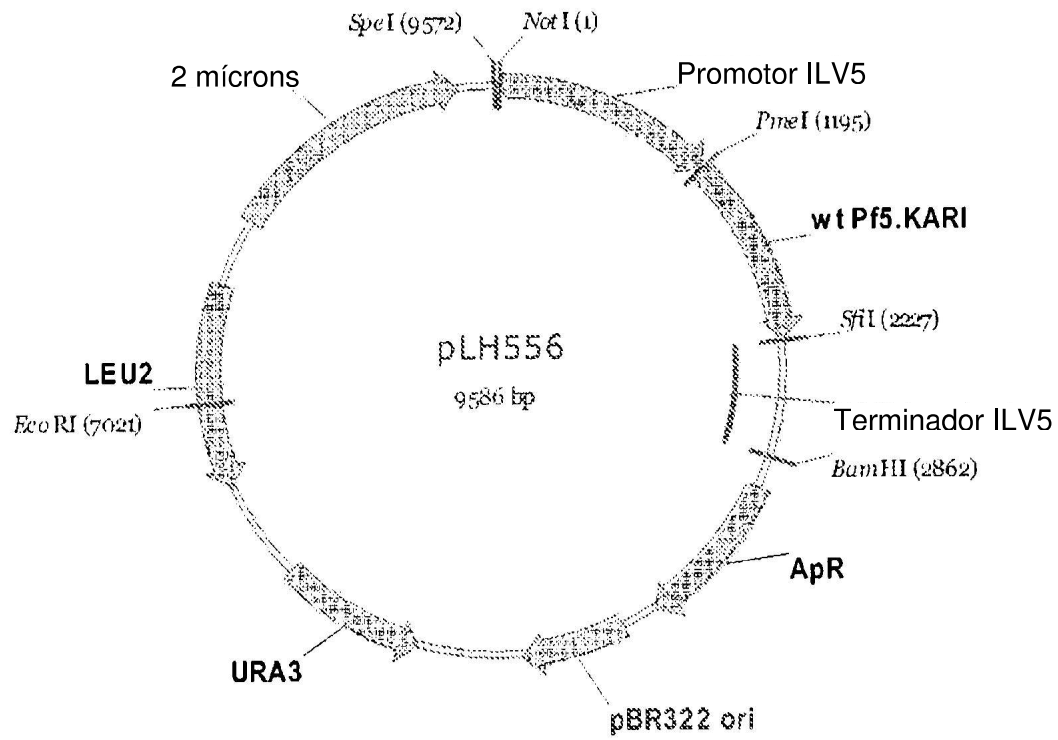
5	K9	(1)	MEECKMAKIYYQEDCNLSLLDGKTI AVIGYSQGHAAHNL <b>A</b> KESG-CNVI
	K1	(1)	-----MAATTWYEK DADLSVFEKGKVAIIGYSQGHAAHNLNRDSG-VDVV
	K2	(1)	-----MAAQIWYENDGDL SVLDGKKVAIIGYSQGHAAHNLNRDSG-VDVV
	K7	(1)	-----MPKMYTEKDTDLNLLRGKKVAIIGYSQGHAAHNLHESG-VDVV
	S2	(1)	-QEELMKVYYDS DADLGLIKSKRIAILCYGSGHAAHNLNRDSGVAEVA
10	K25	(1)	-----MVKVYNEVTDN--IGDKTIAIIGYSQGHAAHNLNRDTG-HNVV
	K26	(1)	-----MAVQMEYEKDVKVPALDGNKIAVIGYSQGHAAHNLNRDTG-HDVI
	L. Lactis	(1)	-----MAVTMYEDDVEVSALAGKQIAVIGYSQGHAAHNLNRDSG-HNVI
	K9	(50)	IGLYEGSKSWKRAEEQGFVYTAEEAAKKADIMILL <b>N</b> DEKQATMYKNDI
	K1	(46)	VGLRPTSKSVEYAKEQGLEVSQVADATAEADVVMILLPDQYQAAYKSEI
15	K2	(46)	VGLRPTSKSVEQAKEQGLEVSVPEAAAAEADIIMILAPDQYQRTIWANDI
	K7	(45)	VGLYNGSKSWAKAEAAAGLQVATVADAATAADLIMILLPDEKQAKIYNEEI
	S2	(50)	IALRPDSASVKKAQDAGFKVLTNAEAAKWADILMILAPDEHQAAIYAEDL
	K25	(43)	IGIRAG-KSAENAKNDGFTVLPVSEAVQOANVVMILAPDEIQGELYEKEI
	K26	(46)	IGVRPG-KSFDKAKEDGFDYTVAEATKLADVIMILAPDEIQQELYEAEI
20	L. Lactis	(46)	IGVRHG-KSFDKAKEDGFETFEVGEAVAKADVIMVLAPDELQQSIYEEDI
	K9	(100)	EPNLEAGNMLMFAHGFNHFGCIVPPKDVDT <b>M</b> IAKPGPGHTVRSEYEEG
	K1	(96)	EPNLKPGAALAFAHGFNHYGYIKPSEDPVFMVAPKPGPHIVRREYTN
	K2	(96)	EPNIKPGAAIAFAHGFNHYGYIKPSEDPVFMVAPKPGPHIVRREYANG
	K7	(95)	APNLEEGNALVFAHGFNHFGQVPPSYVDVFMVAPKPGPHLVRRTYTEG
25	S2	(100)	KDNLRPGSALAFAGLNIHFGLIEPRKIDIVEMIAPKPGHTVRSEYVRG
	K25	(92)	APNLSAGDALAFAHGFNHFEVITPPKEVDVFLVAPKPGPHLVRRTFSEG
	K26	(95)	APNLEAGNAVGFAGHFNHFEFTKVPADVDFVEMCAPKPGPHLVRRTFEEG
	L. Lactis	(95)	KPNLKAGSALGFAGHFNHFGYIKVPEDVDVFMVAPKAPGPHLVRRTYTEG
	K9	(150)	KGVPCLVAVEQDATGKALDMLAYALAI GGARAGVLETTFT <b>T</b> ETETDLFG
30	K1	(146)	RGVPVVVAVEQDPDGKTWPLCLAYAKALGALRAGAIKTTTTEETETDLFG
	K2	(146)	RGVPVVVAVEQDPGRDAWDITLAYAKALGALRAGAIKTTTKEETETDLFG
	K7	(145)	AGVPCLIAVHQDATCKAKQALAYANGIGGARAGVLETTTFKDETETDLFG

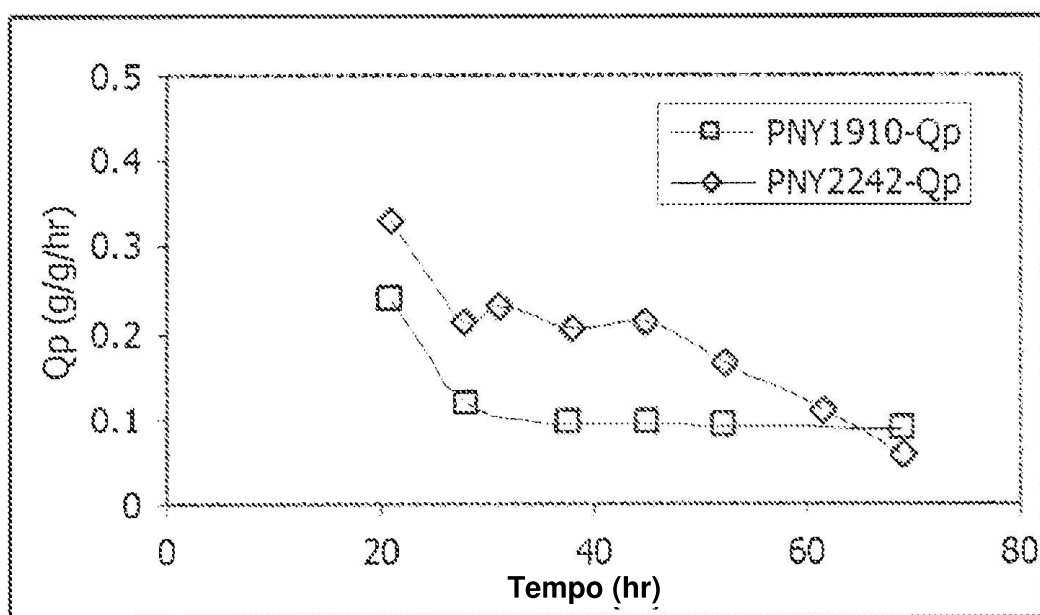
Fig. 3B

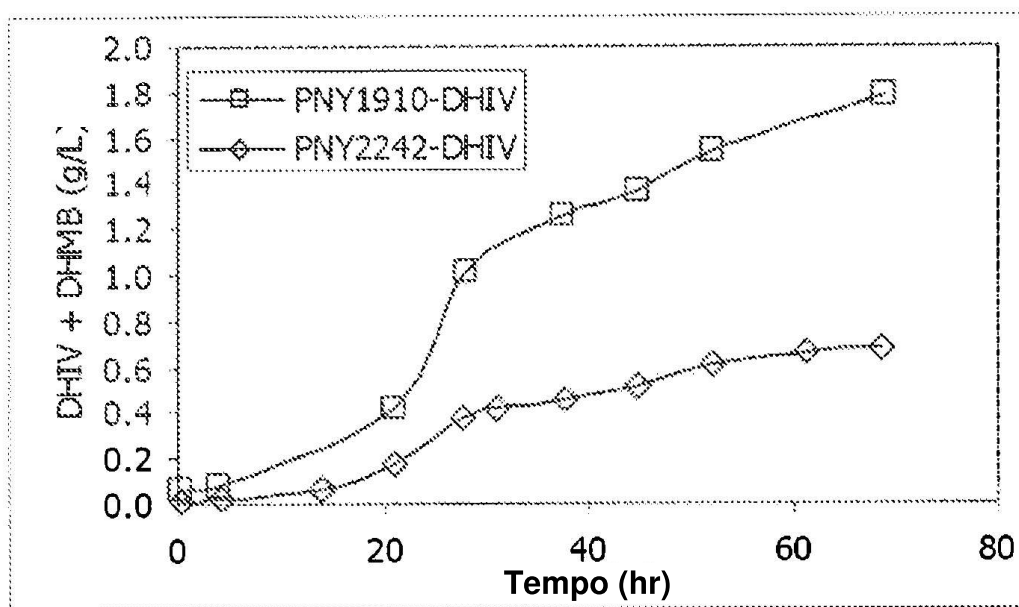
5	S2	(150)	GGVPCLVAVDQDASGNAHDIALAYASGIGGRSGVIETTFREEVETDLFG
	K25	(142)	FAVPALFAVYQDATGNAQETALSYAKGIGATRVGVLETTTFKEETETDLFG
	K26	(145)	FGVPALYAVYQDATGNAKDIAMDWCKGIGIARVGLLETTYKEETEEEDLFG
	L. Lactis	(145)	FGTPALFVSHQNASGHAREIAMDWAKGIGICARVGIIETTFKEETEEEDLFG
10	K9	(200)	EQAVLCGGVCCALMQAGFETLVEAGYDPR <b>R</b> NAYFECIHEMKLIVDLIYQSGF
	K1	(196)	EQDVLMGGINHLCDMGFDVLTEAGYQPEIAYFEVFHELKMLVLDLANEGGL
	K2	(196)	EQNVLMGGVKNLVEMGFEVLTDAGYQPEIAYFEVCHLKMIVDLIMNEGGL
	K7	(195)	EQAVLCGGVSELIKAGFETLVEAGYAPENAYFECMHEMKLIVDLIYQGGGL
15	S2	(200)	EQAVLCGGGLTALITAGFETLVEAGYAPENAYFECMHEMKLIVDLIYEAGI
	K25	(192)	EQAVLCGGGLTSMIETGFTLVEAGYQPELAYFEVCHLKMIVDLIYEGGF
	K26	(195)	EQAVLCGGGLTALITETGFEVLTEAGYAPELAYFEVLHEMKLIVDLIYEGGF
	L. Lactis	(195)	EQAVLCGGGLTALVEAGFETLVEAGYAGELAYFEVLHEMKLIVDLIMYEGGF
20	K9	(250)	SGMRYISNTAEYGDYITGPKIITETTKAMKKILSDIQDGTFAKDFLVD
	K1	(246)	NKARWSCSDTAQYGDYTS--TVITEETKKRMQYQLKRIQDGSFAKEFMDD
	K2	(246)	NKARWSCSDTAQYGDYTN--TVINEDCRKRMQYHLGRIQDGSFAKEFIDD
	K7	(245)	SMRYSISDTAEYGDYQIGRRIITDETKKMKKVLTEIQDGTFAKNWLLLE
25	S2	(250)	ANMRYISNTAEYGDIVSGPRVINEESKKAMKAILDDIQSGRFVSKFVLD
	K25	(242)	AKMRDSISNTAEYGDYVSGSRIITEQTKANMKNVLKDIQNGTFAKGFAD
	K26	(245)	KKMRQSI <del>NTAEFGDYVSGPRVITEQVKENMKAVLADIQNGKFA</del> ND
	L. Lactis	(245)	TKMRQSI <del>NTAEFGDYVTGPRIITDEVKKNMKLVLADIQSGKFA</del> QDFVDD
30	K9	(300)	MSDAGSQVHFKA <del>MRKLASEHPAEVVGEEIRSLYSW</del> SEDKLINN-----
	K1	(294)	QAAG--APKFKKLQEEYSHPHLETVPKPLRAMFSWNNQVDDADADMAESFN
	K2	(294)	QDAG--APKFKELQEEYGNVRIETVPKPLRAMFSWNNGQDDDDADMAT-FT
	K7	(295)	NQTN--RPGFNARRRMEAEHPIEKVKGELRGMMSWIDTAKVD-----
35	S2	(300)	NRAG--QPELKAARKRMAAHPIEQVGARLKRKMPWIASNKLIVDKARN-KL
	K25	(292)	NQAG--FPEFKMREQNGNHPIEKVGSSELRRKMPFVTKD-----
	K26	(295)	YKAG--RPKLTAYREEAANLEIEKVGAELRKAMPFVGQNDDDDAFKIYN--
	L. Lactis	(295)	EKAG--RPKLTAYREAAKNLEIEKIGAE <del>L</del> RQAMPFTQSGDDDDAFKIYQ--

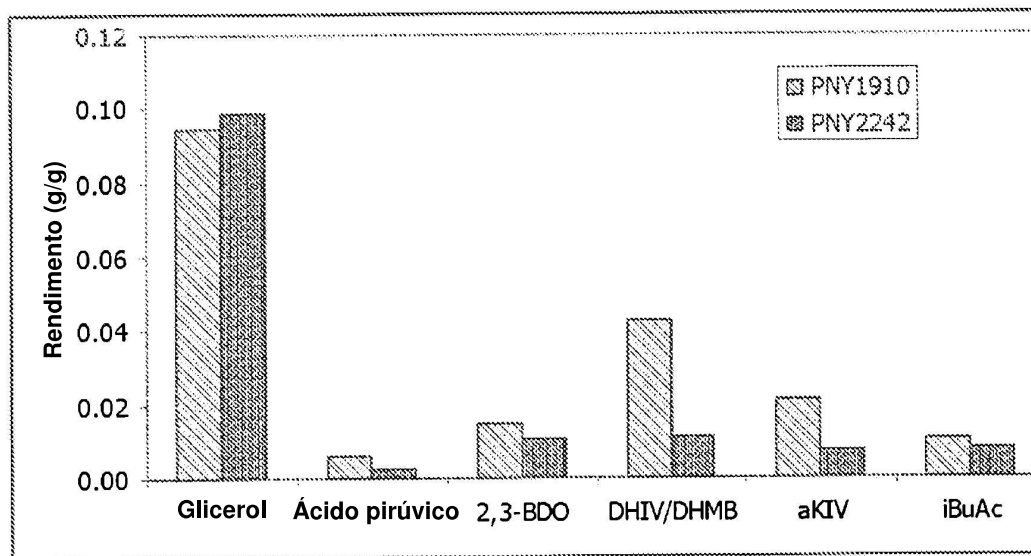
**Fig. 3C**

5	K9	(344)	-----
	K1	(342)	GKIARTQVQ
	K2	(341)	GKIARSQVQ
	K7	(335)	-----
	S2	(347)	GCF-----
10	K25	(329)	-----
	K26	(341)	-----
	L. Lactis	(341)	-----

**Fig. 4** (pLH556)

**Fig. 5**

**Fig. 6**

**Fig. 7**

**Fig. 8**

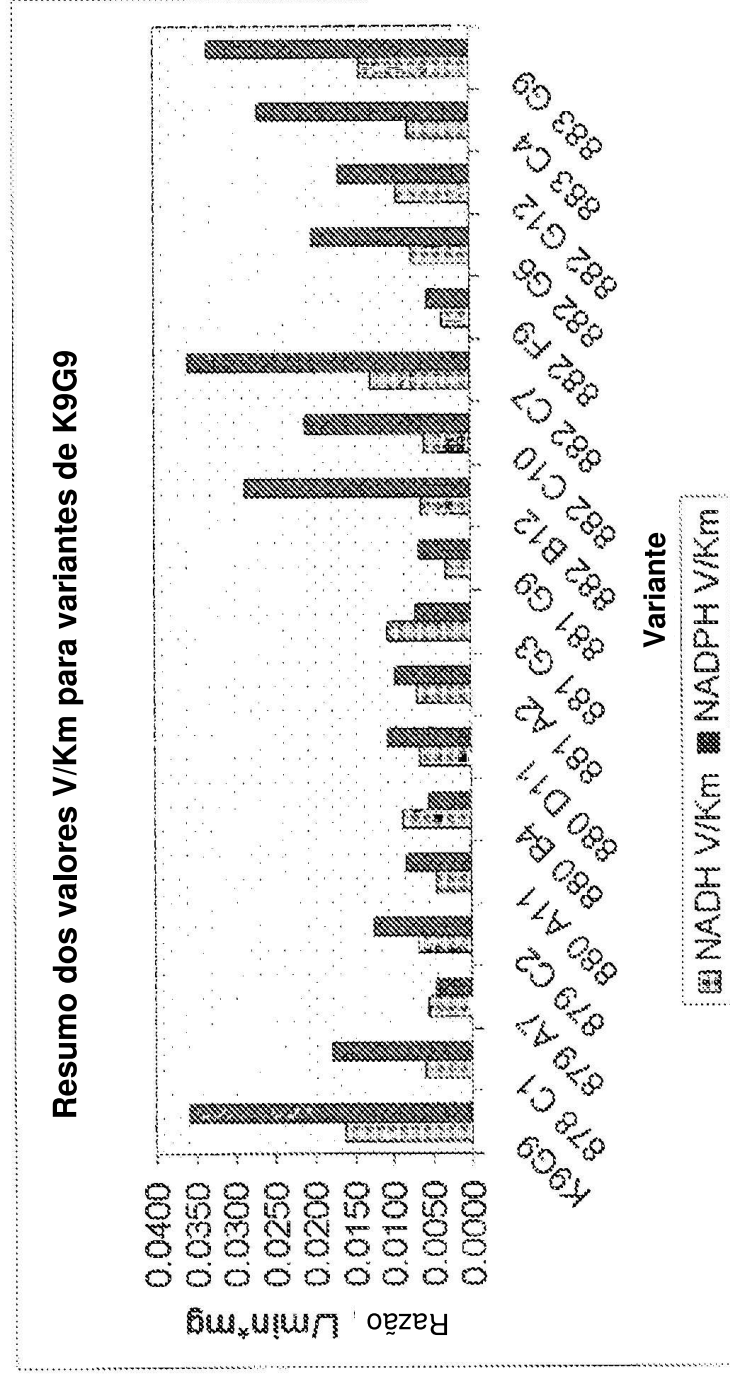




Fig. 9A

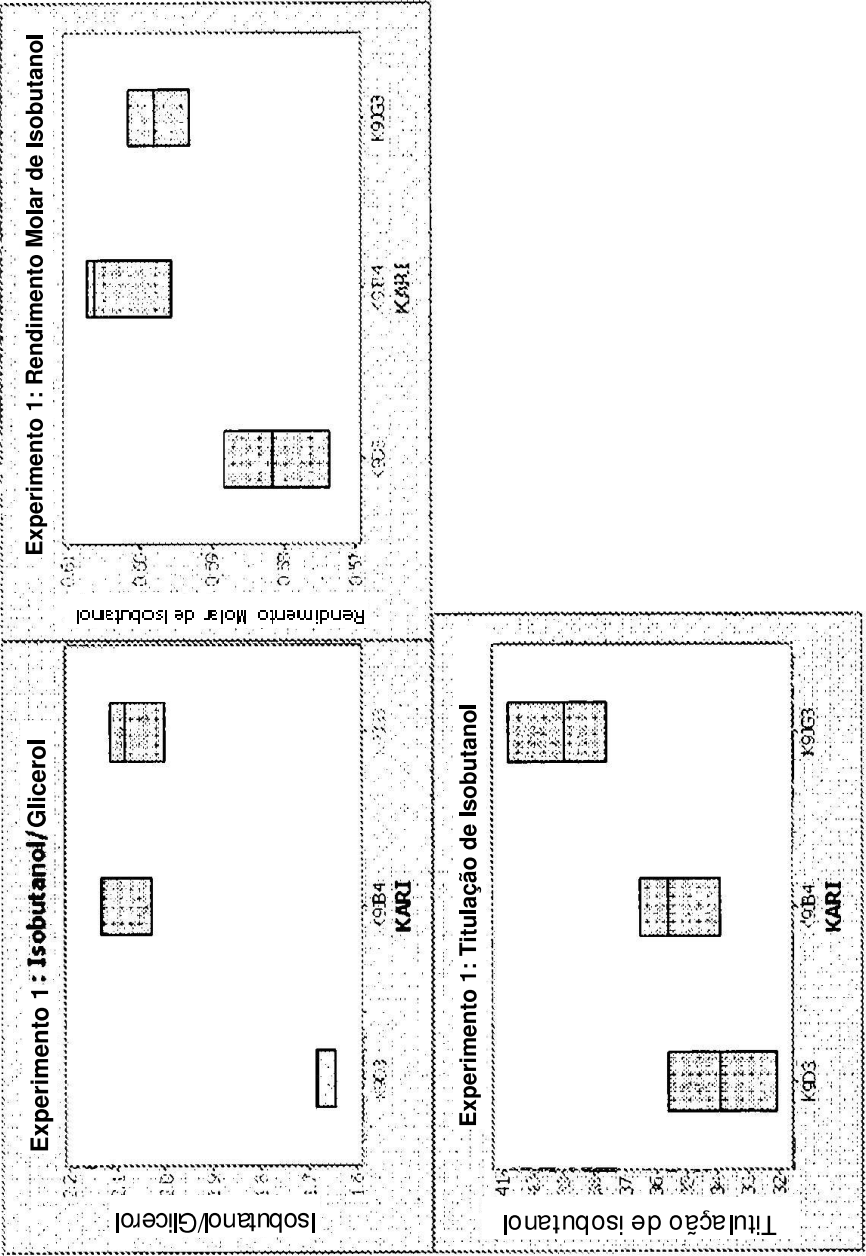


Fig. 9B

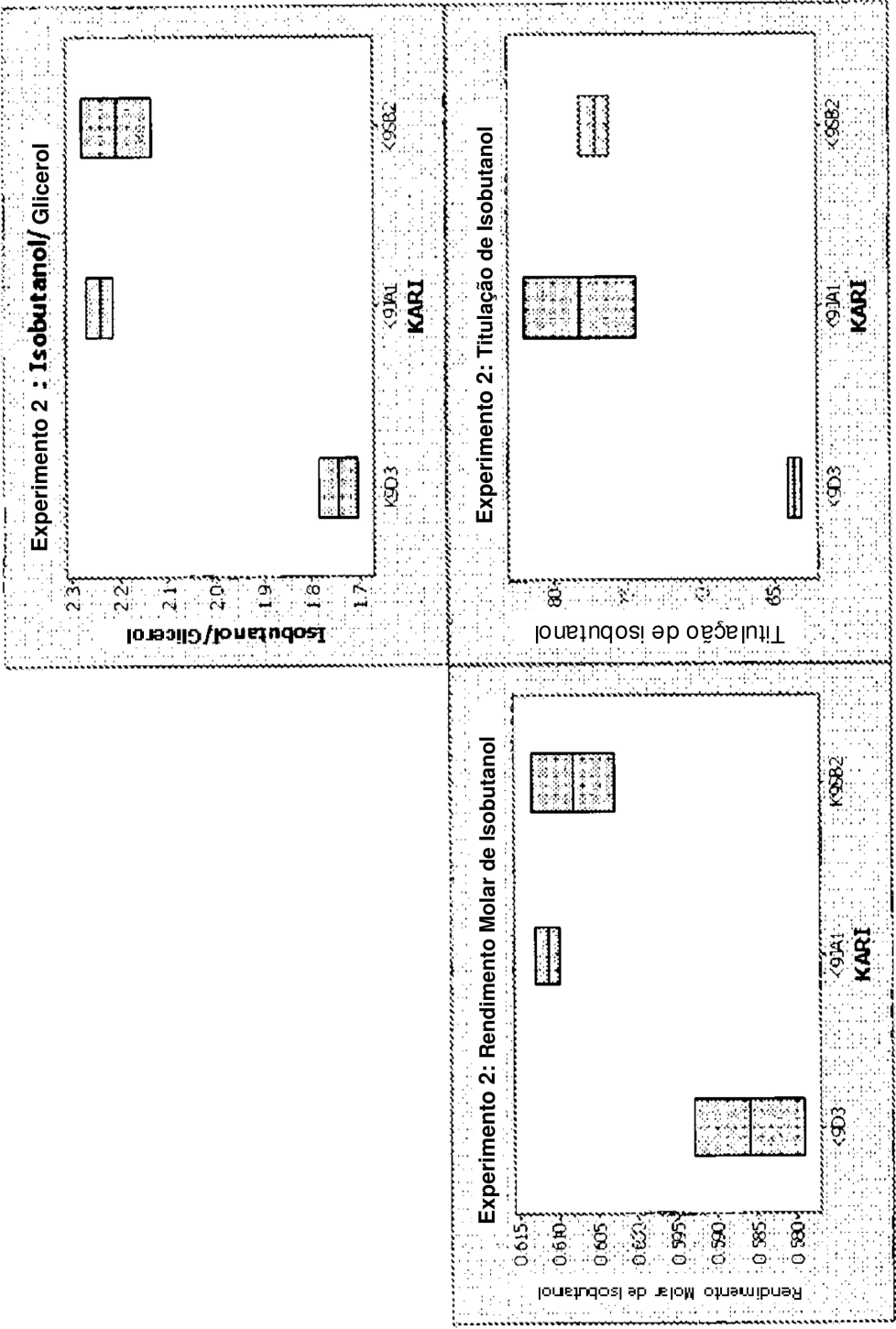
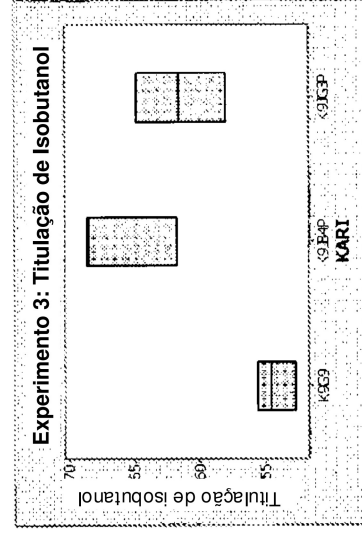
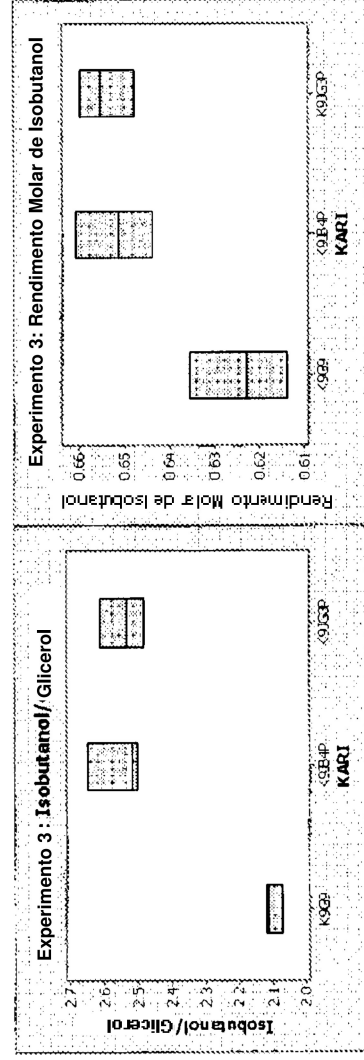
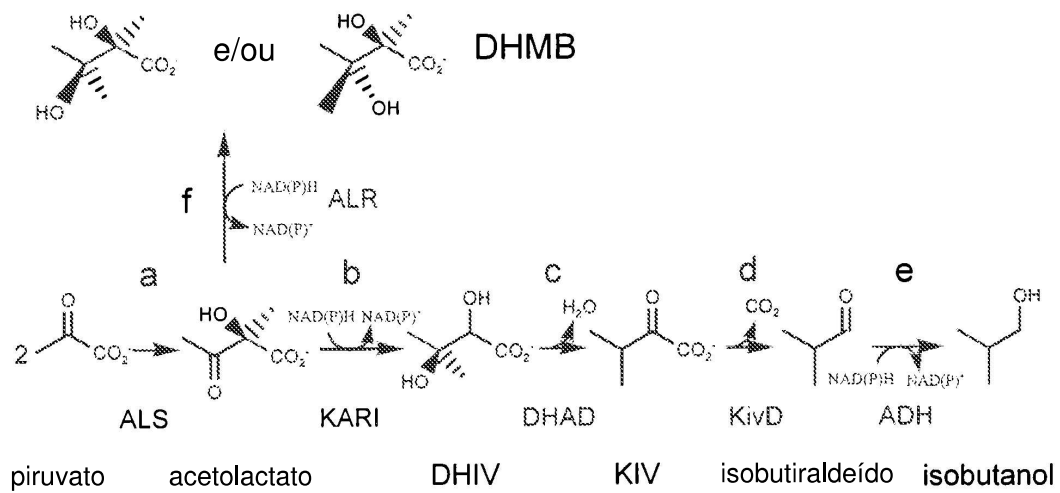
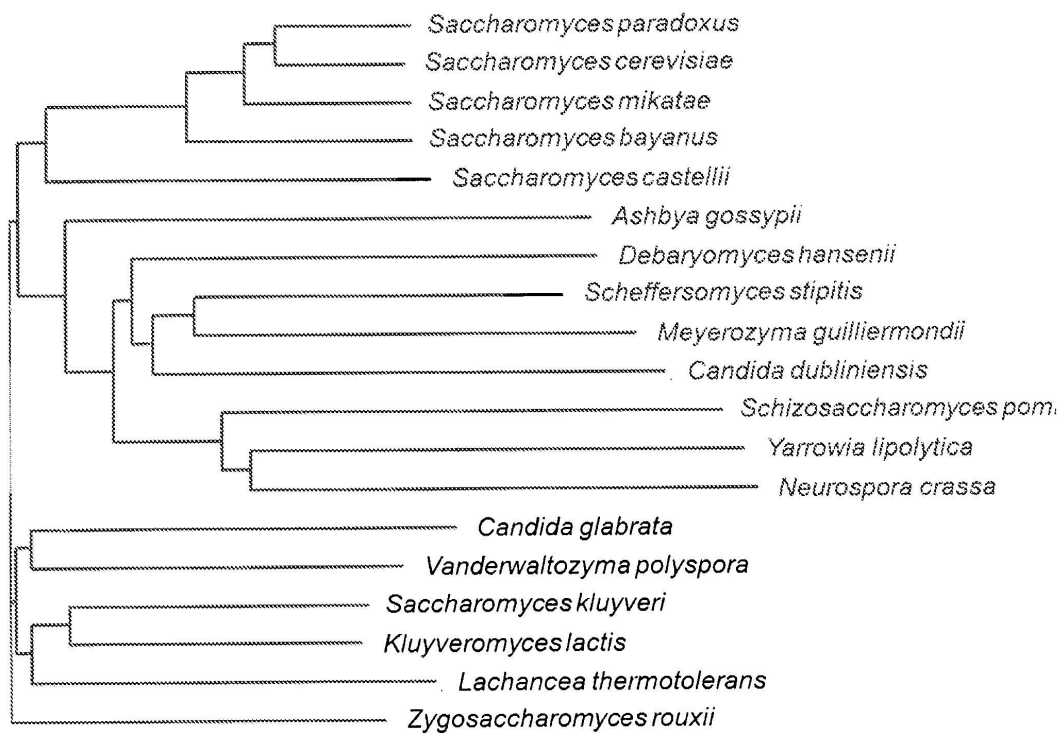


Fig. 9C



**Fig. 10**

**Fig. 11**

**Fig. 12**

	1				50
AABY01000127	.....	.....	.....	.....	.....
AACH01000019	.....	.....	.....	.....	.....
AACA01000631	.....	.....	.....	.....	.....
AACF01000116	.....	.....	.....	.....	.....
AE016819	.....	.....	.....	.....	.....
CR382139	.....	.....	.....	.....	.....
XM_001387479	.....	.....	.....	.....	.....
XM_001482184	ATGTGCCTCT	TACCAGCCGG	TAGCACTGTA	TTATGTCATC	ACCCAGTAGT
XM_002419771	.....	.....	.....	.....	.....
CR380959	.....	.....	.....	.....	.....
XM_001645671	.....	.....	.....	.....	.....
SAKLOH04730	.....	.....	.....	.....	.....
XM_451902	.....	.....	.....	.....	.....
XM_002553230	.....	.....	.....	.....	.....
XM_002494574	.....	.....	.....	.....	.....
YMR226C	.....	.....	.....	.....	.....
NM_001018495	.....	.....	.....	.....	.....
XM_501554	.....	.....	.....	.....	.....
XM_957621	.....	.....	.....	.....	.....
	51				100
AABY01000127	.....	.....	.....AT	GTCCCAAGGT	AGAAAAGCTG
AACH01000019	.....	.....	.....AT	GTCTCAAGGT	AGAAAAGCTG
AACA01000631	.....	.....	.....AT	GTCCCAAGGT	AGAAAAGCTG
AACF01000116	.....	.....	.....AT	GTCTCAAGGT	CCTAAAGCTG
AE016819	.....	.....	.....AT	GTCCCTAGGA	AGAAAAGCAG
CR382139	.....	.....	.....AT	GTCGTACGGA	TCTAAAGCTG
XM_001387479	.....	.....	.....AT	GTCGTTTGGG	AAAAAAGCTG
XM_001482184	GAGTGTGGAG	ATTAAATCCT	CAATCTTCAT	GTCTTTCGGT	GCCAAAGCCG
XM_002419771	.....	.....	.....AT	GTCAATTGGT	AGAAAAGCTG
CR380959	.....	.....	.....AT	GTCTCAAGGA	AGAAAAGCTG
XM_001645671	.....	.....	.....AT	GTCACAGGGT	AGAAAGGCTT
SAKLOH04730	.....	.....	.....AT	GTCTCAAGGT	AGAAGGGCTG
XM_451902	.....	.....	.....AT	GTCTCAAGGT	AGAAAGGCTG
XM_002553230	.....	.....	.....AT	GTCACAGGGA	AGAAGAGCAG
XM_002494574	.....	.....	.....AT	GTCACAAGGT	GTCAAAGCTG
YMR226C	.....	.....	.....AT	GTCCCAAGGT	AGAAAAGCTG
NM_001018495	.....	.....	.....	.....	.....
XM_501554	.....	.....	.....AT	GTCTTTCGGA	GATAAAGCTG
XM_957621	.....	.....	.....AT	GTCTTCAGC	.....AGTAG
	101				150
AABY01000127	CAGAAA.GAT	TGGCTAACAA	GACCGTGCTC	ATTACGGGTG	CCTCTGCTGG
AACH01000019	CAGAAA.GAT	TGGCTGGCAA	AACCGTTCTC	ATCACGGGTG	CCTCTGCTGG
AACA01000631	CAGAAA.GAT	TGGCCAACAA	GACGGTGCTC	ATTACAGGCG	CTTCTGCTGG
AACF01000116	CCGAAA.GAT	TGAATGAGAA	GATTGTGTTT	ATCACTGGTG	CTTCAGCTGG
AE016819	CTGAAA.GAT	TAGCCAACAA	AATTGTGCTT	GTGACTGGTG	CCTCTGCGGG
CR382139	CTGAAC.GTG	TTGCCAATAA	GATTGTCTTA	ATCACTGGTG	CTTCATCTGG
XM_001387479	CTGAAA.GAC	TTGCCAACAA	AATCATCTTT	ATCACCGGGG	CTTCGTCTGG
XM_001482184	CTGAAC.GCC	TTGCCAACAA	GATCATATTG	ATCACTGGGG	CATCGTCTGG
XM_002419771	CTGAAA.GAT	TAGCCAATAG	ATCCATTCTT	ATCACTGGTG	CTTCATCTGG
CR380959	CTGAGA.GGT	TACAAGGCAA	GATTGCCTTT	ATTACGGGTG	CCTCTGCGGG
XM_001645671	CAGAAA.GGT	TGGCTGGTAA	AACGTGTATTA	ATTACAGGTG	CTTCATCAGG
SAKLOH04730	CAGAAA.GAC	TAGCAACCAA	GACCGTTTTT	ATAACTGGCG	CCTCTGCCGG

XM_451902	CTGAAA.GAT	TGCAAAACAA	GACAATTTTC	ATTACCGGTG	CTTCTGCAGG
XM_002553230	CTGAAA.GAC	TGGCAGGAAA	GACTGTCTTC	ATCACAGGCG	CATCAGCCGG
XM_002494574	CTGAAA.GAC	TAGCTGGTAA	GACTGTATTC	ATTACAGGTG	CTTCTGCAGG
YMR226C	CAGAAA.GAT	TGGCTAAGAA	GACTGTCCTC	ATTACAGGTG	CATCTGCTGG
NM_001018495	ATGAGCCGTT	TGGATGGAAA	AACGATTTTA	ATCACTGGTG	CCTCTTCTGG
XM_501554	CTGCTC.GAC	TTGCGGGCAA	GACCGTCTTT	GTTACCGGCG	CCTCGTCCGG
XM_957621	CCAAGC.GCC	TCGCGGGCAA	GACCATTGTC	ATAACCGGAG	CGTCCTCAGG

	151				200
AABY01000127	TATTGGTAAG	GCCACCGCAT	TAGAGTATTT	G...GAGGCA	TCCAATGGTG
AACH01000019	TATTGGCAAA	GCCACTGCAT	TAGAGTATTT	G...GAGGCA	TCCAATGGCG
AACA01000631	TATTGGTAAG	GCCACCGCAT	TGGAGTATTT	G...GAAGCA	TCCAATGGAA
AACF01000116	TATTGGGCAA	GCCACCGCTT	TGGATATACAT	G...GATGCG	TCGAACGGTA
AE016819	CATTGGCCGT	GCTACAGCCA	TTAACTATGC	A...GACGCG	ACGGACGGGG
CR382139	AATTGGTGAA	GCAACTGCCA	AAGAAATTGC	A...TCAGCC	GCTAATGGCA
XM_001387479	TATTGGTGAA	GCTACAGCTA	GAGAGTTTGC	A...TCTGCT	GCCAATGGGA
XM_001482184	TATAGGCGAG	GCTACCGCCA	GAGAATTCGC	T...GCTGCT	GCCAATGGAA
XM_002419771	GATTGGTGAA	GCATGTGCTA	AAGTTTTTCGC	T...GAAGCA	TCTAATGGTC
CR380959	CATCGGTAAG	GCTACAGCCA	TTGAGTATTT	G...GATGCT	TCCAATGGTA
XM_001645671	GATTGGGAAA	GCCACTGCAT	TAGAATATCT	A...GATGCC	TCCAATGGTC
SAKLOH04730	CATTGGCCAA	GCTACTGCTT	TGGAATACTG	T...GATGCT	TCTAACGGTA
XM_451902	TATTGGTCAA	GCCACAGCAT	TGGAATATCT	A...GATGCT	GCTAACGGTA
XM_002553230	TATCGGTCAG	GCCACTGCGC	AAGAATACCT	G...GAAGCA	TCCGAAGGCA
XM_002494574	TATCGGTCAG	GCAACTGCAA	AGGAATATTT	G...GATGCA	TCCAATGGTC
YMR226C	TATTGGTAAG	GCGACCGCAT	TAGAGTACTT	G...GAGGCA	TCCAATGGTG
NM_001018495	AATTGGAAAA	AGCACTGCTT	TTGAAATTGC	C...AAAGTT	GCCAAAG...
XM_501554	CATTGGCCAG	GCCACTGTTC	TCGCTCTAGC	C...GAAGCT	GCCAAGGGCG
XM_957621	AATCGGGCGT	AGCACAGCCT	TCGAGTTTGC	GCGGACCGCG	CCCAACCACG

	201				250
AABY01000127	ATATGAAACT	GGTCTTAGCT	GCTAGAAGAT	TAGAAAAGCT	CGAGGAATTA
AACH01000019	ATATGAAATT	AATCTTAGCC	GCTAGAAGAT	TAGAAAAGCT	CGAGGAATTG
AACA01000631	ACATGAAACT	GATCTTGGCT	GCGAGGAGAT	TGGAGAAGCT	AGAGGAGCTG
AACF01000116	CTGTGAAATT	GGTTCTAGTT	GCCAGAAGAT	TGGAGAAATT	ACAACAATTG
AE016819	CAATCAAGTT	GATTTTGGTG	GCAAGACGCG	CAGAAAAGCT	CACCAGCTTG
CR382139	ATTTAAATTT	AGTGTTGTGT	GCTAGACGAA	AAGAAAAGTT	GGATAATTTA
XM_001387479	ATATCAGATT	GATTTTGGCA	GCCAGAAGAA	AAGAAAAGTT	GGCTCAATTG
XM_001482184	AAATTCTGTT	GATTTTGGAC	GCTCGGAGAG	AAGACAACT	CAAGTCTCTC
XM_002419771	AAGTTAAATT	AGTTTGTAGG	GCAAGAAGAA	AAGAACGATT	AGTTAAATTA
CR380959	GTGTGAAGCT	AGTTCTTGGT	GCACGTAGAA	TGGAGAAATT	GGAGGAGTTG
XM_001645671	ATATGAAGTT	AATTTTAGTT	GCAAGAAGAT	TAGAAAATTT	GCAAGAGTTG
SAKLOH04730	AAATAAACTT	GGTGTTAAGT	GCCAGAAGGC	TGGAAAAATT	GCAAGAGTTA
XM_451902	ATGTCAAATT	GATCTTAGCA	GCAAGAAGGT	TGGCTAAGTT	GGAAGAATTG
XM_002553230	AAATCAAGTT	GATCCTTGCA	GCAAGAAGAC	TCGACAAGCT	GGAGGAAATC
XM_002494574	AAATTAAATT	GATCTTGGCT	GCAAGAAGAT	TAGAGAAATT	ACACGAGTTT
YMR226C	ATATGAAACT	GATCTTGGCT	GCTAGAAGAT	TAGAAAAGCT	CGAGGAATTG
NM_001018495	...TAAACT	TATTTTGGCT	GCTCGCAGAT	TTTCTACCGT	TGAAGAAATT
XM_501554	ACCTCAAGTT	TGTGCTTGCT	GCCCCACGAA	CCGACCGTCT	GGACGAGCTC
XM_957621	GCCTCAAGCT	GATCTTGACG	GCCCCCGCG	TCGATGCCCT	GGAGCAGATT

	251				300
AABY01000127	AAGAAAACCTA	TTGATCAGG.	AGTTTCCA..	AACGCCAAAG	TTCATGTGGC
AACH01000019	AAGAAGACTA	TCGATGAAG.	AGTTTCCA..	AACGCCAAAG	TCCATGTGAC
AACA01000631	AAGAAGACCA	TCGACGAGG.	AGTTTCCC..	AATGCCAAAG	TTCACGTTGG
AACF01000116	AAGGAAGTCA	TTGAGGCAA.	AATACCCT..	AAGAGTAAAG	TCTATATTGG
AE016819	AAACAGGAGA	TCGA.AAGCA	AGTATCCC..	AACGCCAAGA	TCCATGTGCG
CR382139	TCT.AAAGAA	TTGACTGACA	AATATTCA..	TCCATCAAGG	TTCATGTTGC

XM_001387479	TCA.GACTCA	TTGACCAAGG	AATTTCCA..	ACTATCAAAA	TCCATTCTGC
XM_001482184	TCG.CAACAA	TTGAGCCTCA	TTTACCCG..	CAAATTAATA	TCCATTCTGC
XM_002419771	TCT.GATACT	TTAATTAAAC	AATATCCT..	AATATTAATA	TTCATCATGA
CR380959	AAG.AAGGAA	TTGCTGGCTC	AATATCCT..	GATGCAAAGA	TTCATATAGG
XM_001645671	AAGGAAACAA	TTTGTAAG.	AATATCCA..	GAATCTAAGG	TTCATGTTGA
SAKLOH04730	AAGGACAAAA	TCACCAAGG.	AGTATCCT..	GAAGCCAAGG	TTTATATTGG
XM_451902	AAGGAAAAAA	TCAATGCTG.	AATACCCA..	CAAGCTAAAG	TATATATCGG
XM_002553230	AAAGCCAAGG	TTTCTAAAG.	ACTTCCCT..	GAAGCACAGG	TGCATATCGG
XM_002494574	AAAGAACAAA	CTAC.AAAGA	GTTACCCA..	AGCGCTCAAG	TCCACATTGG
YMR226C	AAGAAGACCA	TTGATCAAG.	AGTTTCCA..	AACGCAAAAG	TTCATGTGGC
NM_001018495	GCAAAGGAGT	TAGA.ATCGA	AATAT....	GAAGTATCGG	TTCTTCCTCT
XM_501554	AAGAAGAAGC	TGGAGACCG.	ACTACAAG..	GGTATCCAGG	TGCTGCCTTT
XM_957621	GCCAAGGAGA	TCCGCCAAGA	GGTTGGCGAG	GGCGTGCAAG	TGCTGCCTGT

	301				350
AABY01000127	CCAAGTGGAT	ATCACTCAAG	CAGAAAAGAT	CAAGCCCTTT	ATTGAGAAAT
AACH01000019	CAAGTGGAC	ATCACACAGA	CAGAAAAGAT	CAAGCCCTTT	ATTGAAAAT
AACA01000631	CCAAGTGGAT	ATCACACAGG	CCGAGAAGAT	CAAGCCCTTC	ATTGAAAAT
AACF01000116	GAAGTTGGAT	GTGACAGAGC	TTGAGACCAT	TCAACCATTC	TTGGATAATC
AE016819	ACAATTGGAT	GTGACCCAAC	TGGACCAGAT	CCGCCCATT	TTGGAGGGAC
CR382139	TCAACTAGAT	GTATCTAAGC	TCGAGACTAT	CAAGCCATT	ATCAATGATT
XM_001387479	CAAAATTGGAT	GTGACCGAAC	ATGATGGCAT	CAAGCCCTTC	ATTTCTGGTT
XM_001482184	TCGTCTTGAT	GTCTCTGAGT	TTTCGTCACT	TAAGCCGTT	ATTACTGGGT
XM_002419771	TTTTTTTGAT	GTTACTATTA	AAGATTCAAT	TTCAAAATTC	ATTGCTGGAA
CR380959	TAAACTGGAT	GTTACAGACT	TTGAAAACGT	CAAGCAGTT	TTGGCTGACT
XM_001645671	AGAATTAGAT	ATTTCTGATA	TTAATAGAAT	CCCAGAATTT	ATTGCAAAAT
SAKLOH04730	TGTGCTTGAT	GTGACCGAAA	CGGAAAAAAT	CAAACCATTC	TTGGATGGTT
XM_451902	TCAATTGGAC	GTCAGTGA	CTGAGAAGAT	TCAACCTTT	ATTGATAACT
XM_002553230	CCAGCTAGAT	GTGACTCAGA	CGGACAAAAT	CCAGCCCTTT	GTGACAAAT
XM_002494574	TAAATTGGAC	GTCAGTGA	TTGACACCAT	AAAACCATTT	TTGGATAAAT
YMR226C	CCAGCTGGAT	ATCACTCAAG	CAGAAAAAAT	CAAGCCCTTC	ATTGAAAAT
NM_001018495	TAAATTGGAT	GTTTCTGATT	TGAAGTCTAT	TCCTGGGGTA	ATTGAGTCAT
XM_501554	CAAGCTGGAC	GTGTCCAAGG	TCGAGGAGAC	CGAGAACATT	GTGTCCAAGC
XM_957621	CAAGCTGGAC	GTCAGCCAGC	CGGAGGAGGT	CAGGGGGTTT	GTTGGGAAT

	351				400
AABY01000127	TGCCAAAGGA	GTTCAAAGAC	ATTGACATTT	TGGTGAACAA	CGCTGGGAAG
AACH01000019	TGCCAGAGGA	GTTCAAAGAC	ATTGATATTC	TGGTGAACAA	CGCTGGTAAG
AACA01000631	TGCCGAGGAC	ATTCAAGGAT	ATTGACATCC	TGATAAACAA	TGCCGGCAAA
AACF01000116	TTCTTGAGGA	ATTAAAGGAT	ATTGATATCT	TGATTAATAA	TGCCGGGAAG
AE016819	TACCTGAGGA	GTTCCGAGAC	ATTGATATTT	TAATTAACAA	CGCAGGTAAG
CR382139	TACCGAAAGA	ATTCTCTGAC	GTGGATGTAT	TAGTCAACAA	TGCAGGCTTG
XM_001387479	TACCAAGGA	TTTCGCGGAC	ATCGATGTGT	TGATCAACAA	TGCTGGAAAA
XM_001482184	TGCCAAAGGA	TTTGTCTAGC	ATCGACGTTT	TGGTGAATAA	TGCGGGGAAA
XM_002419771	TTCTCATGA	ATTTG..AAC	CT.GATGTAT	TAATTAATAA	TAGTGGTAAA
CR380959	TGCCAGAAGA	GTTCAAGGAC	ATCGACATCC	TGATCAATAA	CGCTGGTAAA
XM_001645671	TACCTGAAGA	ATTCAAAGAT	ATTGATATAT	TGATTAACAA	TGCAGGTAAA
SAKLOH04730	TACCAGAAGA	ATTTAAAGAT	ATTGACATCT	TGATCAATAA	TGCAGGCAAA
XM_451902	TGCCGGAAGA	ATTCAAGGAT	ATCGATATTT	TGATTAACAA	TGCCGGTAAA
XM_002553230	TGCCCGAAGA	GTTCAAAGAC	ATCGACATCC	TGATCAACAA	CGCGGGCAAG
XM_002494574	TACCAAGGA	ATTTCAAGAT	ATCGATATTT	TGATCAACAA	TGCCGGTAAG
YMR226C	TGCCACAAGA	GTTCAAGGAT	ATTGACATTC	TGGTGAACAA	TGCCGGAAAG
NM_001018495	TGCCAAAGGA	ATTTGCTGAT	ATCGATGTCT	TGATTAATAA	TGCTGGACTT
XM_501554	TGCCCAAGGA	GTTTCCGAG	GTGGACGTGC	TTATCAACAA	CGCCGGCATG
XM_957621	TGCCCGAGGA	GTGGAGGGAT	ATCCATGTGC	TGGTCAATAA	TGCTGGTCTC



AABY01000127	GCCCTTGGTA	CCGACCGTGT	GGGGGAGATT	GCAACACAAG	ATATCCAGGA
AACH01000019	GCTCTTGGTA	CGGACCGTGT	TGGGGAGATT	GATACACAGG	ACGTCCAGGA
AACA01000631	GCCCTGGGCT	CCGAACGTGT	CGGGGAAATT	GCCACACAGG	ACATCCAGGA
AACF01000116	GCATTAGGTT	CCGATCGTGT	AGGTGATATT	GATATAAAAG	ATGTGAAGGG
AE016819	GCCCTCGGCA	CTGAGAGGGT	GGGGGAAATC	TCGATGGACG	ATATCCAGGA
CR382139	GCTTTGGGCC	GTGATGAAGT	TGGAACCATT	GACACAGATG	ATATGTTATC
XM_001387479	GCTCTTGGA	AAGCATCTGT	TGGTGAAATC	AGTGACAGTG	ATATCCAAGG
XM_001482184	GCATTGGGAA	GAGCCAATGT	TGGTGAAATT	TCCCAAGAGG	AAATCAATGG
XM_002419771	GCCTTGGGGA	AAGAAGAAGT	TGGAGAATTG	AAAGATGAAG	ATATTACGGA
CR380959	CGCTTGGGGT	CTGACAAAGT	TGGAGACATT	GACCCTGAGG	ATATCGCAGG
XM_001645671	GCATTAGGAA	GTGATACTAT	TGGTAATATC	GAGAATGAGG	ATATTAAAGG
SÄKL0H04730	GCGTTAGGCT	CTGATCCTGT	TGGTACCATC	AAAAGTGAAG	ATATTGAAGG
XM_451902	GCTTTGGGAT	CTGATGTTGT	CGGTACCATC	AGTAGCGAGG	ACATCAAAGG
XM_002553230	GCGCTCGGAT	CCGACCCCGT	GGGCACAATC	GACCCCAATG	ATATTCAAGG
XM_002494574	GCATTAGGTA	CTGATAAAGT	TGGTGATATT	GCAGATGAAG	ACGTGGAAGG
YMR226C	GCTCTTGGCA	GTGACCGTGT	GGGCCAGATC	GCAACGGAGG	ATATCCAGGA
NM_001018495	GCTCTAGGTA	CCGATAAAGT	CATTGATCTT	AATATTGATG	ACGCCGTTAC
XM_501554	GTCCACGGCA	CCGAAAAGGT	TGGCTCCATC	AACCAGAACG	ACATTGAGAT
XM_957621	GTAAGG..	.....A..GC	TCCCTCCATC	GCCGAAGAAG	ACATCAACGT

	451				500
AABY01000127	TGTGTTTGAC	ACCAACGTCA	CAGCTTTAAT	TAATATCACT	CAAGCTGTGC
AACH01000019	CGTGTTTCGAC	ACCAACGTCT	CGGCTTTGAT	TAATGTCACA	CAGGCTGTTC
AACA01000631	CGTGTTTCGAC	ACCAACGTCA	CGGCGTTGAT	CAACGTCACG	CAAGCAGTGC
AACF01000116	AATGATGGAT	ACCAATGTCT	TGGGGTTGAT	CAATGTGACG	CAAGCTGTGT
AE016819	GGTTTTCAAC	ACTAATGTTA	TCGGCTTGGT	GCACTTGACT	CAGGAGGTTT
CR382139	GATGTTTCAA	ACTAATGTTT	TAGGGTTAAT	TACCATCACA	CAGGCTGTTT
XM_001387479	CATGATGCAA	ACGAATGTCT	TGGGACTCAT	CAACATGACT	CAGGCTGTGA
XM_001482184	CATGTTCCAT	ACCAATGTTC	TTGGGTTGAT	AAACTTAACT	CAGGAGGTGT
XM_002419771	AATGTTTGAT	ACTAATGTCA	TTGGAGTCAT	TCGTATGACT	CAAGCAGTTT
CR380959	AATGGTTAAC	ACCAACGTCC	TTGCATTGAT	CAATTTAACA	CAATTGTTGT
XM_001645671	TATGTTTGAG	ACTAACGTTT	TTGGATTAAT	CTGTTTAACA	CAAGCTGTAC
SÄKL0H04730	AATGATCAAC	ACCAATGTCT	TAGCTCTTAT	CAATATTACT	CAAGCTGTCT
XM_451902	TATGATAGAT	ACTAACGTTG	TTGCCCTTAT	CAACGTTACC	CAAGCTGTTT
XM_002553230	CATGATCCAG	ACTAACGTTA	TCGGGCTTAT	AAATGTTACC	CAAGCCGTTC
XM_002494574	TATGTTTCGAC	ACCAATGTCT	TGGGGTTAAT	CAAAGTTACT	CAAGCTGTTT
YMR226C	CGTGTTTGAC	ACCAACGTCA	CGGCTTTAAT	CAATATCACA	CAAGCTGTAC
NM_001018495	CATGATTACT	ACCAATGTTC	TTGGTATGAT	GGCTATGACT	CGTGC GGTTT
XM_501554	CATGTTCCAC	ACAAACGTGC	TCGGACTCA	TTCTGTCACT	CAGCAGTTTG
XM_957621	CATGTTTGCC	ACCAACGTCA	CCGGCCTGAT	CAACATGACC	CAAGCCATCC

	501				550
AABY01000127	TGCCCATT	TCAAGCCAAG	AACTCAG...	.....G	GGATATTGTG
AACH01000019	TGCCCATCTT	CCAAGCTAAG	AACTCAG...	.....G	GGATATTGTG
AACA01000631	TGCCAATTTT	CCAAGCCAAG	AACTCAG...	.....G	GGACATCGTC
AACF01000116	TGCACATTTT	CCAAAAGAAG	AACTCCG...	.....G	TGATATTGTG
AE016819	TACCTATTAT	GAAAGCCAAG	AATTCCG...	.....G	GGACATTGTC
CR382139	TGCCAATCAT	GAAAAAGAAG	AACAGCG...	.....G	AGATGTTGTT
XM_001387479	TTCCCATTTT	TAAGGCTAAA	AATTCTG...	.....G	AGATATCGTC
XM_001482184	TACCCATCTT	CAAAAAGAAA	AATGCTG...	.....G	AGATATTGTG
XM_002419771	TACCTTTACT	TAAAAA	CCTTATG...	.....C	TGATGTGGTT
CR380959	TGCCATTATT	CAAGAAGAAG	AACAGTG...	.....G	TGATATCGTC
XM_001645671	TTCCAATATT	CAAGGCTAAA	AATGGTG...	.....G	TGATATTGTC
SÄKL0H04730	TGCCAATCTT	CAAAGCCAAG	AATTTCG...	.....G	TGATATCGTA
XM_451902	TGCCTATTTT	CAAAGCAAAG	AATTCCG...	.....G	TGACATCGTT
XM_002553230	TGCCCATCTT	CAAGGCCAAA	AACTCTG...	.....G	TGATATCGTG
XM_002494574	TACCTATCTT	CAAAAGAAAA	AATTCTG...	.....G	TGATGTCGTT

YMR226C	TGCCCATATT	CCAAGCCAAG	AATTCAG...	.....G	AGATATTGTA
NM_001018495	TTCCTATATT	CTACAGCAAA	AACAAGG...	.....G	TGATATTTTG
XM_501554	TCGGCGAGAT	GCGAAAGCGA	AACAAGG...	.....G	CGACATTGTC
XM_957621	TGCCCATCTT	CAAGGCCCGC	GGCTCCGAGG	GTGGTTCGGG	AGACATTGTC

	551		600
AABY01000127	AACCTGGG.T	TCGGTGGCTG	GCAGGGATGC ATACCCAACG GGTTCCATCT
AACH01000019	AACCTGGG.C	TCGGTAGCTG	GCAGAGATGC ATACCCAACG GGCTCCATCT
AACA01000631	AACCTGGGGC	TCGGTGGCCG	GCAGAGACGC ATACCCCAACA GGCTCCATCT
AACF01000116	AACCTAGG.T	TCAGTTGCTG	GAAGAGATGC ATACCCAACA GGGTCCATTT
AE016819	AATGTTGG.G	TCGATTGCCG	GCCGCGAAGC CTACCCTGGT GGCTCTATTT
CR382139	AATATAGG.T	TCAATTGCTG	GAAGAGACTC TTACCCTGGA GGTGGAATTT
XM_001387479	AACATCGG.T	TCGATTGCTG	GAAGAGACCC TTACCCTGGG GGATCGATCT
XM_001482184	AACATTGG.C	TCAGTGGCCG	GTAGAGAACC TTACCCTGGA GGTGCAGTAT
XM_002419771	TTCATTGG.A	AGTATTGCTG	GACGTGTTCC TTATAAAAAT GGAGGTGGTT
CR380959	AACCTGGG.A	TCGATTGCTG	GTAGAGACGC ATACCCAACG GGTGCTATAT
XM_001645671	AATTTAGG.G	TCAATTGCAG	GCATAGAAGC TTACCCAACA GGATCTATAT
SÄKL0H04730	AACCTGGG.G	TCTGTCGCTG	GTAGAGATGC TTATCCAACC GGTGCAATCT
XM_451902	AACCTAGG.T	TCTGTTGCCG	GTAGAGATGC ATATCCAAC T GGTTCATCT
XM_002553230	AACCTGGG.T	TCTGTCGCTG	GCAGAGAAGC TTACCCTACA GGATCTATTT
XM_002494574	AACATTAG.T	TCGGTTGCTG	GTAGAGAGGC ATACCCAGGT GGTTCCATTT
YMR226C	AATTTGGG.T	TCAATCGCTG	GCAGAGACGC ATACCCAACA GGTTCATCT
NM_001018495	AACGTTGG.C	AGTATTGCCG	GCAGAGAATC ATACGTAGGC GGCTCCGTTT
XM_501554	AACATTGG.C	TCCATCGCCG	GACGAGAGCC CTACGTTGGA GGAGGAATCT
XM_957621	AACATCGG.T	TCTATTGCCG	GGAGAGAACC ATACGCGGGA GGCTCCATCT

	601		650
AABY01000127	ATTGTGCCTC	CAAGTTTGCC	GTGGGGGCGT TCACTGATAG TTTAAGAAAG
AACH01000019	ATTGTGCATC	TAAGTTTGCC	GTCGGGGCTT TCACTGAGAG TTTGAGAAATG
AACA01000631	ACTGTGCTTC	CAAGTTTGCC	GTCGGTGCGT TCACTGACAG TTTGAGAAAG
AACF01000116	ACTGTGCTTC	TAAATTTGCC	GTGAGGGCCT TTAAGTAAAG TTTGAGAAAG
AE016819	ACTGTGCCAC	GAAACATGCG	GTCAAGGCTT TCACCAGGGC CATGCGGAAG
CR382139	ACTGTCCAAC	TAAGGCAAGT	GTCAAGTCGT TTTGCGAAGT TTTAAGAAAG
XM_001387479	ACTGTGCCTC	CAAGGCTGCT	GTTAAGTTCT TCTCGCATTC TTTGAGAAAG
XM_001482184	ACTGTGCTTC	AAAGGCAGCA	GTTAACTACT TTTCTCATTC TTTGAGAAAG
XM_002419771	ATTGTGCATC	TAAAGCTGCT	GTTTCGTAGT TCACCGATAC ATTTAGAAAA
CR380959	ACTGTGCAAC	AAAACATGCT	GTCAGGGCAT TCACACAATC CTTAAGGAAG
XM_001645671	ATTGTGCAAC	TAAATTTGCA	GTTAAAGCAT TCACTGAAAG TTTAAGAAAG
SÄKL0H04730	ACTGTGCTAG	CAAACATGCA	GTCAGAGCCT TCACTCAAAG TTTGAGGAAG
XM_451902	ATTGTGCTTC	GAAGCATGCT	GTCAGAGCGT TCACTCAGTC TTTGAGAAAA
XM_002553230	ACTGCGCTAC	GAAGCACGCG	GTGCGTGCTT TCACCCAGAG CCTGCGCAAG
XM_002494574	ACTGTGCTAC	TAAACACGCT	GTTAAGGCAT TCACTGAAAG TTTGCGTAAG
YMR226C	ATTGTGCCTC	TAAGTTTGCC	GTGGGGGCGT TCACTGATAG TTTGAGAAAG
NM_001018495	ACTGCTCTAC	CAAGTCTGCC	CTTGCTCAAT TCACTCCGC TTTGCGTAAG
XM_501554	ACTGTGCCAC	CAAGGCCGCC	GTGCGATCTT TCACTGAGAC TCTCCGAAAA
XM_957621	ACTGCGCCAC	CAAGGCTGCT	GTGCGCAGCT TCACCGACGC GCTGCGCAAG

	651		700
AABY01000127	GAGCTTATCA	ACACCAAGAT	CAGAGTCATC CTAATCGCAC CAGGGCTAGT
AACH01000019	GAACCTATAA	ACACTAAGAT	TAGAGTCATT CTAATTGCAC CAGGGTTAGT
AACA01000631	GAACCTGATCA	ACACGAAGAT	CAGAGTTATC TTGATCGCGC CGGGGCTGGT
AACF01000116	GAATTAATTA	ATACCAAGAT	TAGGGTGATA TTGATAGCCC CGGGTATCGT
AE016819	GAGCTCATTA	GCACCAAGAT	CCGGGTCTTC GAAATTGCGC CGGGCTCTGT
CR382139	GAATTGATTA	GCACCAAGAT	TAGAGTTCTT GAGGTTGACC CTGGTAATGT
XM_001387479	GAACCTATTA	ACACCAAGAT	CAGAGTTTGT GAAGTTGATC CAGGTGCTGT
XM_001482184	GAAACTATCA	ATTCCAAAAT	CAGGGTCATG GAGGTGGATC CTGGGGCAGT
XM_002419771	GAAACTATTA	ATACTGGTAT	TAGAGTCATT GAAGTTGATC CAGGTGCTGT

CR380959	GAATTGATCA	ACACCGACAT	TAGAGTAATT	GAAATTGCTC	CTGGTATGGT
XM_001645671	GAATTGATTA	ATACAAAGAT	CAGAGTTATT	GAAATTGCAC	CAGGTATGGT
SAKLOH04730	GAATTGGTGA	ACACCAATAT	CAGAGTGATT	GAAATTGCTC	CGGGTAATGT
XM_451902	GAATTAATCA	ATACTGGTAT	TAGGGTCATT	GAGATTGCTC	CAGGTAATGT
XM_002553230	GAAGTATCA	ACACAAACAT	CAGGGTTATT	GAGGTCGCTC	CAGGTAACGT
XM_002494574	GAATTAGTCG	ATACAAAAAT	CAGAGTCATG	AGTATTGATC	CTGGTAATGT
YMR226C	GAGCTCATCA	ACACTAAAAT	TAGAGTCATT	CTAATTGCAC	CAGGGCTAGT
NM_001018495	GAGACTATTG	ACACTCGCAT	TCGTATTATG	GAGGTTGATC	CTGGCTTGGT
XM_501554	GAGAACATCG	ACACTCGAAT	CCGAGTCATT	GAGGTTGATC	CTGGAGCCGT
XM_957621	GAGCTGATCG	CCACGCGCAT	CCGTGTCATG	GAGATTGACC	CTGGCCAGGT

	701		750
AABY01000127	CGAAACTGAA	TTTTCACTGG	TTAGATACAG
AACH01000019	CGAAACTGAG	TTTTCCCTGG	TTAGATACAG
AACA01000631	TGAGACCGAG	TTCTCACTGG	TCAGATACAG
AACF01000116	CGAAACTGAA	TTCTCAGTTG	TTAGATACAA
AE016819	AGAAACGGAA	TTCTCCATGG	TTCGTATGCG
CR382139	TGAAACTGAA	TTTTCAAATG	TCAGATTCAA
XM_001387479	GTTGACCGAG	TTCTCTTTGG	TTCGTTTCCA
XM_001482184	AGAGACAGAG	TTCTCGTTGG	TTCGTTTGGG
XM_002419771	ACTTACTGAA	TTTAGTGTTG	TTCGTTTATAA
CR380959	CGAAACCGAG	TTTTCTGTGG	TCAGGTACAA
XM_001645671	TAACACTGAA	TTTTCTGTAA	TTAGATATAA
SAKLOH04730	TGAAACCGAG	TTTTCCCTTAG	TTAGATATAA
XM_451902	CGAAACTGAG	TTCTCTCTAG	TTAGATACAA
XM_002553230	GGAGACCGAG	TTTTCTCTGG	TTAGATACAA
XM_002494574	AGAGACCGAA	TTTTCTATGG	TTAGATTCCG
YMR226C	CGAGACTGAA	TTTTCACTAG	TTAGATACAG
NM_001018495	CGAAACCGAA	TTCAGCGTTG	TGAGATTCCA
XM_501554	TGAGACCGAG	TTCTCCGTGG	TGCGATTCCG
XM_957621	CGAGACCGAG	TTCAGCGTGG	TGAGGTTCTA

	751		800
AABY01000127	AGAATGTCTA	CAA.GGACAC	CACCCCATTA
AACH01000019	AGAATGTTTA	CAA.GGACAC	CACTCCGTTG
AACA01000631	AAAACGTCTA	CAA.GGACAC	TACGCCGTTG
AACF01000116	AATCTGTCTA	CGATGGAGTT	CACCCCTTGG
AE016819	AGAAAGTGTA	CCA.GGGATT	TGAACCCCTA
CR382139	AGCTGGTTTA	CGC.GGGTAC	TGAACCATTA
XM_001387479	ATGCTGTTTA	TGA.AGGTAC	CCAACCTTTG
XM_001482184	AAAAGGTGTA	TGA.GGGAAC	CGAGCCTTTG
XM_002419771	ATGCTGTTTA	TAC.TGGTAC	TGAACCATTA
CR380959	ACGACGTCTA	CAG.AGGTAC	AACACCACTA
XM_001645671	ATAAAGTTTA	TGA.AAACAC	TACTCCTTTA
SAKLOH04730	AAAAGGTTTA	TGA.AGGTAC	TAACCCATTA
XM_451902	AACAGGTTTA	CAA.AGGTAC	TACTCCTCTA
XM_002553230	AGAAGGTTTA	CGA.AGGCAC	ACAACCCCTT
XM_002494574	AGAAGGTTTA	CCA.AGACAC	TGTCCCATTA
YMR226C	AGAATGTTTA	CAA.GGATAC	TACCCCATTTG
NM_001018495	ATAATGTTTA	CAA.AAATAG	TGAGCCTTTG
XM_501554	ACGCTGTTTA	CGC.TGGAAC	CGAGCCTCTG
XM_957621	ATGCCGTCTA	TGC.CGGTGT	CGATCCCTTG

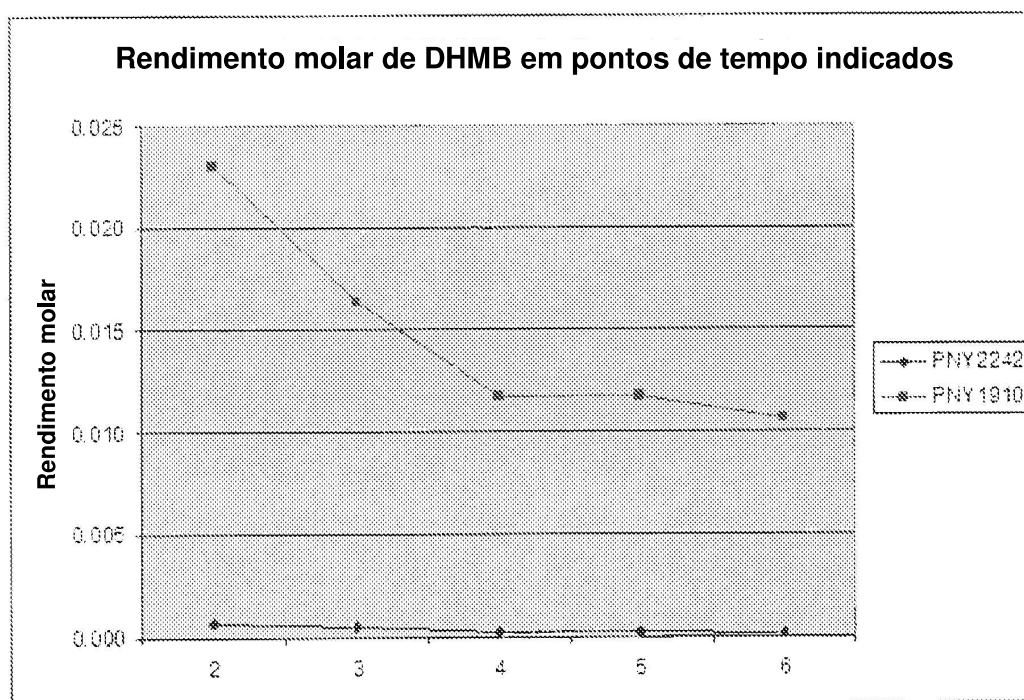
	801		850
AABY01000127	TTTGATCGTG	TACGCAACTT	CCAGGAAACA
AACH01000019	TTTGATTGTG	TATGCGACTT	CAAGGAAGCA
AACA01000631	CTTAATCGTA	TATTCCACTT	CCAGAAAGCA

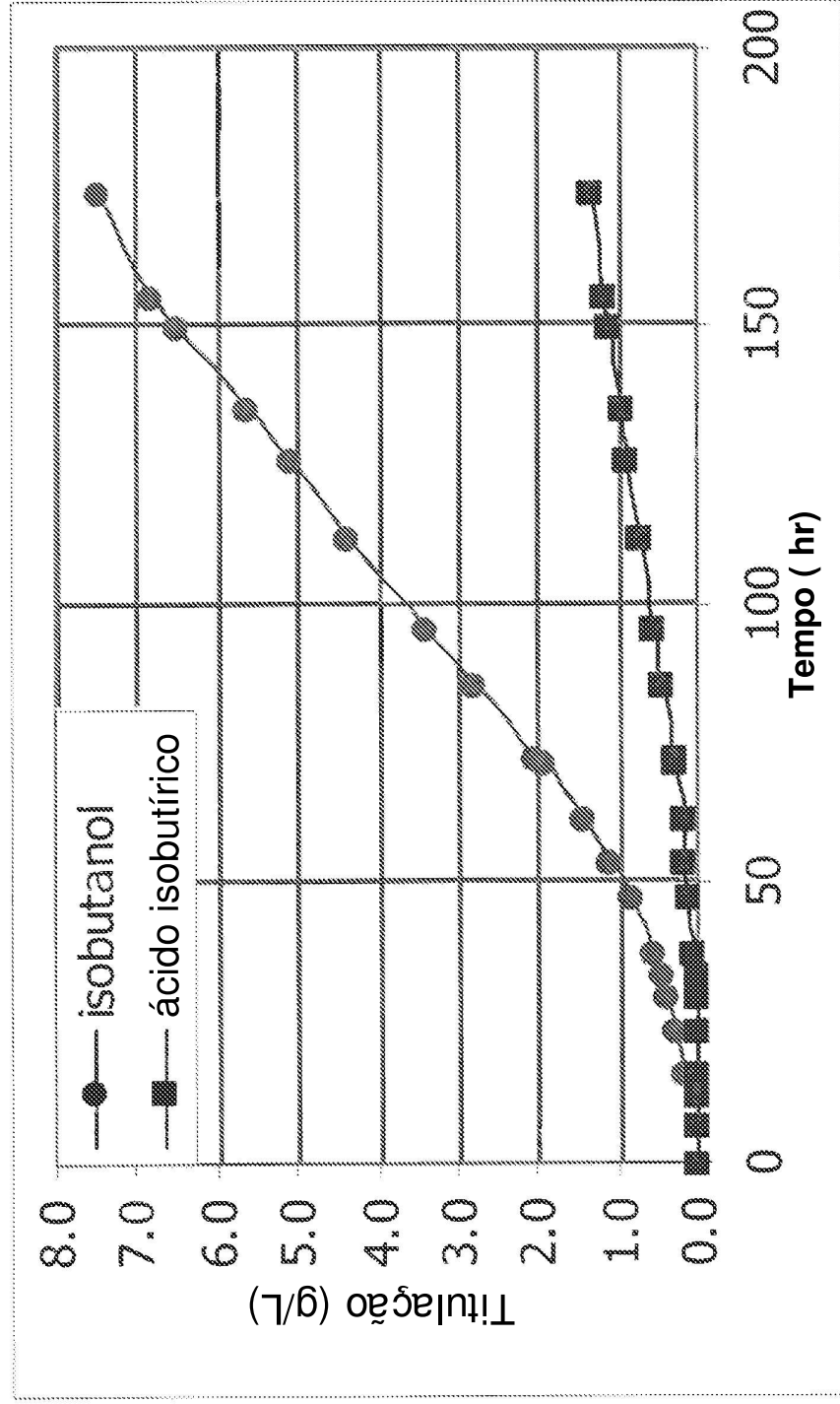
AACF01000116	TTTAATTGTA	TACACCACTT	CAAGAAAACA	GAACACAGTA	ATTGCTGACA
AE016819	TACAATTGTC	TATGCCACAT	CCAGAAGATC	CAACACCGTA	GTTGCAGAGA
CR382139	GGTTGTCGTA	TTCGGACTTA	CAAGAAAAGCA	AAATACCGTT	ATTGCTGAGA
XM_001387479	AGTTATCGTG	TTTGGTATCA	CCAGAAAAGCA	GAACACCGTC	ATAGCCGAAA
XM_001482184	AATCATTGTG	TTTGCTGTGT	CGAGAAAAGC	CAAAACTGTC	ATTGCGGAAA
XM_002419771	AGTGGTTGTT	TTTGCATCTT	CAAGAAAACA	AAATACCGTT	ATTGCTGATA
CR380959	TTTGATTGTG	TACTCTACCA	GCAGAAAAGCC	AAACATGGTG	GTAGCAGATG
XM_001645671	TTTGATAGTT	TACACCACTT	CTAGAAAATC	GAATACCGTT	ATCGCTGATG
SÄKLOH04730	CCTTATTGTG	TATGCTACTT	CTAGAAAAGCC	TAATACTGTC	ATTGCGGATG
XM_451902	CTTGATCGTT	TATGCCACTT	CAAGAAAACC	TAATACTGTC	ATCGCTGATG
XM_002553230	CCTAATCGTT	TACGCAACCT	CGAGAAAACC	AAACACCGTC	ATCGCGGACG
XM_002494574	TTTAATCGTC	TATGCAACCT	CTAGAAAAGCA	AAACACTGTC	ATTGCTGACA
YMR226C	TCTGATCGTC	TATGCAACTT	CCAGAAAACA	AAATACTGTA	ATTGCAGACA
NM_001018495	GGTGATTCTT	TTTGCCCTCA	CTCGCAGAGA	AAACGTCGTT	ATTGCCGATA
XM_501554	GTTTCATCACC	TACACTCTCA	CTCGACGAGA	GAATGTCGTC	ATTGCCGATA
XM_957621	GATCGTGGTG	TTCGTCGTAA	CACGACGGGA	GAACGTTGTT	GTTGCTGATA

	851				900
AABY01000127	CGCTAATCTT	TCCAACCAAC	CAAGCATCGC	CTCACCACAT	CTTCCGTGGA
AACH01000019	CACTAATCTT	TCCTACCAAC	CAAGCGTCAC	CTTACCATAT	CTTTCGCGGG
AACA01000631	CCCTGATCTT	CCCCACCAAC	CAAGCCTCGC	CCTACCACAT	CTTTCGCGGT
AACF01000116	CTTTGATATT	CCCAACCTCT	CAAGGTTCCG	CATTCCACGT	CCATCGCGAT
AE016819	TGGTCGTTTA	CCCATCCGCG	CAAGGTTCTC	TGTACGATAC	TCACCGCAAC
CR382139	CATTAGTCTT	TTCAACCAAT	CAAGCCAGCT	CATCTCACTT	ATACCGTGAA
XM_001387479	CCTTGGTATT	CCCAAGTCAC	CAGGCTTCTG	CCTCTCATGT	TTACAAGGCT
XM_001482184	CTTTGGTGTT	TCCTACCCAT	CAGGCTGGAG	CAGTTCATGT	TCATAGAGGG
XM_002419771	CTTTGATTTT	CCCAAATCAT	CAAGCTTCTC	CAGATCATGT	TTATAGAAAA
CR380959	TCCTGGTCTT	CCCAACACAC	CAGGCATCGG	CTTCGCACAT	CTACAGGGGC
XM_001645671	TTTTGGTATT	CCCAACATGC	CAAGCTTCTG	CATCCCATAT	CTATCGTGGA
SÄKLOH04730	TTTTGGTTTT	TGCTTCAAAC	CAAGCATCCC	CTTACCATAT	CTATCGCGGT
XM_451902	TTTTGGTATT	TGCTTCCAAC	CAAGCATCTC	CTTACCACAT	TTACCGTGGC
XM_002553230	TTTTGGTTTT	CGCTTCCGAAC	CAGGCTTCGC	CTTACCACAT	TTACCGTGGT
XM_002494574	CTTTGATCTT	CTCTTCTAAC	CAGGCATCAC	CATACCACCT	CTACAGAGGC
YMR226C	CTTTAATCTT	TCCAACAAAC	CAAGCGTCAC	CTCATCATAT	CTTCCGTGGA
NM_001018495	CACCTGTTTT	CCCATCCCAT	CAAGGTGGTG	CCAATCATGT	GTACAGAAAG
XM_501554	CTCTCATTTT	CCCCAACCAC	CAGGCTTCTC	CTACTCACGT	CTACCGAAAG
XM_957621	CGTTGGTCTT	CCCTAGCCAT	CAGGCTGGCG	CTGGTATTAT	GCACCGCAAG

	901		921
AABY01000127	TGA.....		. (SEQ ID NO:41)
AACH01000019	TGA.....		. (SEQ ID NO:47)
AACA01000631	TAA.....		. (SEQ ID NO:43)
AACF01000116	TAA.....		. (SEQ ID NO:45)
AE016819	TAA.....		. (SEQ ID NO:49)
CR382139	AGCGATAAAT	AA.....	. (SEQ ID NO:53)
XM_001387479	CCTAAGTAG.		. (SEQ ID NO:55)
XM_001482184	CCGCTTGAGT	GA.....	. (SEQ ID NO:57)
XM_002419771	CCTAATTAA.		. (SEQ ID NO:61)
CR380959	GACTAA....		. (SEQ ID NO:51)
XM_001645671	TAA.....		. (SEQ ID NO:59)
SÄKLOH04730	GACTAA....		. (SEQ ID NO:69)
XM_451902	GAATAG....		. (SEQ ID NO:67)
XM_002553230	TAG.....		. (SEQ ID NO:65)
XM_002494574	TCTCAAGACA	AAACCAATTG	A (SEQ ID NO:63)
YMR226C	TAA.....		. (SEQ ID NO:24)
NM_001018495	CAAGCGTAG.		. (SEQ ID NO:73)
XM_501554	AACTGA....		. (SEQ ID NO:71)

XM\_957621 TCGACATGA . . . . . (SEQ ID NO: 75)

**Fig. 13**

**Fig. 14**

**RESUMO****“CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR  
ISOBUTANOL E POLIPEPTÍDEO”**

Trata-se de células hospedeiras de levedura recombinantes e métodos para o seu uso para a produção de isobutanol. As células hospedeiras de levedura fornecidas compreendem uma via biossintética de isobutanol e pelo menos um dentre atividade de aldeído desidrogenase reduzida ou eliminada, atividade de acetolactato redutase reduzida ou eliminada; ou um polinucleotídeo heterólogo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de cetoácido redutoisomerase.



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



458BE1FB53E28FE4

Campo 2



F68C1021B96EF726

**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 2013 09 04\_0153-3345\_SEQLIST\_CAN.txt
- Data de Geração do Código: 23-09-2013
- Hora de Geração do Código: 07:47:40
- Código de Controle:
  - Campo 1: 458BE1FB53E28FE4
  - Campo 2: F68C1021B96EF726