



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

(21) BR 112019012266-4 A2



(22) Data do Depósito: 15/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 28/01/2020

(54) **Título:** CÉLULA DE LEVEDURA OLEAGINOSA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ÁLCOOL GRAXO DESSATURADO E/OU UM ACETATO DE ACILA GRAXO DESSATURADO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, KIT DE PARTES, ÁLCOOL GRAXO DESSATURADO, E, USO DE UM ÁLCOOL GRAXO DESSATURADO, UM ACETATO DE ACILA GRAXO DESSATURADO OU UM ALDEÍDO GRAXO DESSATURADO.

(51) **Int. Cl.:** C12N 9/02; C12P 7/04.

(30) **Prioridade Unionista:** 16/12/2016 EP 16204769.0.

(71) **Depositante(es):** DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET.

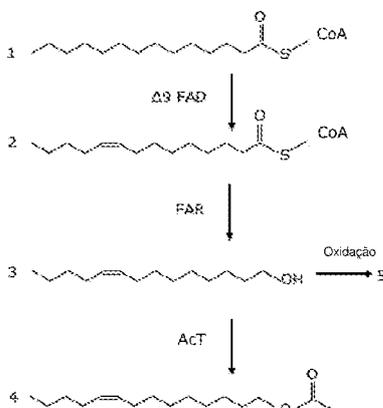
(72) **Inventor(es):** IRINA BORODINA; CARINA HOLKENBRINK; MARIE INGER DAM; CHRISTER LÖFSTEDT.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2017083021 de 15/12/2017

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/109163 de 21/06/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 14/06/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se às células de levedura oleaginosas para a produção de álcoois graxos e derivados dos mesmos, em particular álcoois graxos dessaturados, acetatos de acila graxos dessaturados e aldeídos graxos dessaturados. Também são providos métodos para a obtenção de tais compostos, que são úteis nas composições de feromônio.



CÉLULA DE LEVEDURA OLEAGINOSA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ÁLCOOL GRAXO DESSATURADO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, E, KIT DE PARTES

Campo Técnico

[001] A presente invenção refere-se a células de levedura oleaginosas para a produção de álcoois graxos e derivados dos mesmos, em particular álcoois graxos dessaturados, acetatos de acila graxos dessaturados e aldeídos graxos dessaturados. Também são providos métodos para a obtenção de tais compostos, que são úteis nas composições de feromônio.

Fundamentos

[002] Álcoois graxos são um grupo de produtos químicos com amplas aplicações. Álcoois graxos são usualmente álcoois primários retos que variam no comprimento da cadeia (C_6 - C_{26}) e podem carregar ligações carbônicas saturadas ou insaturadas. Dependendo das características mencionadas acima, os álcoois graxos podem ser usados como combustível, detergentes e tensoativos, cosméticos, controle de pragas de inseto e muito mais.

[003] Desde o advento do DDT mais do que 50 anos atrás, inseticidas neurotóxicos de amplo espectro têm provido os meios principais para o controle de insetos economicamente importantes na agricultura e programas de saúde pública. Apesar de que o uso de inseticidas sintéticos inicialmente resultassem em aumentos espectaculares nos rendimentos de safra e a supressão de alguns vetores de doença humana e animal importantes, o desenvolvimento de resistência a inseticida em populações de praga de inseto e o dano ambiental causado pelos inseticidas tem se tornado amplamente reconhecido como sérias desvantagens para o seu uso. Entre os problemas ambientais mais significantes associados com a fabricação e uso de inseticidas são 1) a sua toxicidade direta para os organismos não alvos (incluindo seres humanos); 2) a sua persistência na biosfera onde eles podem

acumular e causar efeitos desenvolvimentais e reprodutivos adversos em organismos superiores; 3) poluição de fonte pontual significativa associada com a sua fabricação e distribuição; 4) a sua dispersão no mundo todo.

[004] Feromônios podem ser usados como controle de praga ao invés de pesticidas. (Z)19-14:OAc por exemplo foi descoberto romper a eficiência do combinação da lagarta do cartucho do milho com 86% de eficiência quando aplicado sozinho, isto é sem outros componentes de feromônio. O uso comercial de feromônios para controlar pragas de inseto pelo rompimento do combinação tem diversas vantagens em relação aos inseticidas convencionais. Os feromônios são: 1) não tóxicos e ambientalmente benignos; 2) específicos para uma espécie alvo e não afetam adversamente insetos benéficos não alvo, tornando-os extremamente bem apropriados para o uso nos programas de controle de praga integrados; e 3) muito menos provável (e nunca foi mostrado) produzir resistência no inseto alvo. Ao contrário da síntese de feromônio na natureza, métodos correntes para a produção comercial de feromônios utilizam vias químicas sintéticas tradicionais. Porque os feromônios requerem pureza muito alta para evocar uma resposta do inseto, estas sínteses são caras e difíceis, e geram grandes quantidades de resíduos orgânicos que requerem tratamento.

[005] Assim o principal obstáculo que se encontra no caminho de usar feromônios sexuais permanece no custo de produção. Como um resultado, uma parte muito grande de terra agrícola global utiliza feromônios (estimado a menos do que 0,05%). A produção de feromônio a partir de uma fábrica de célula é esperado diminuir significativamente os custos de produção de feromônios.

[006] Os álcoois graxos são usualmente produzidos quimicamente com base nas matérias-primas petroquímicas ou naturais. Alguns métodos foram feitos para produzir álcoois graxos em microorganismos tais como *Escherichia coli* e levedura usando matéria-prima renovável tal como por

exemplo glicose. Os hospedeiros preferíveis para a produção oleoquímica microbiana são levedura oleaginosas, que são especializadas em acumular e consumir compostos derivados de lipídeo. Entre as leveduras oleaginosas pesquisa mais avançada foi conduzida sobre a levedura *Yarrowia lipolytica*.

[007] Métodos e cepas hospedeiras são necessárias para melhorar a produção de álcoois graxos e derivados dos mesmos.

Sumário da invenção

[008] A invenção é como definida nas reivindicações.

[009] Os álcoois graxos podem ser produzidos em microorganismos pela expressão heteróloga da enzima acil redutase graxa que reduz os ésteres graxos de acil-CoA nativamente produzidos para álcoois graxos. Nos microorganismos os ésteres graxos de acil-CoA são usados para a produção de lipídeo de membrana ou armazenado em corpos lipídicos. Alguns microorganismos são capazes de degradar álcoois graxos. *Y. lipolytica* degrada produtos químicos derivados de ácido graxo derivados por intermédio da beta-oxidação, que ocorre nos peroxissomas, ou por intermédio do caminho da ômega-oxidação, ocorrendo no retículo endoplasmático.

[0010] A presente divulgação provê métodos e cepas hospedeiras que aumentam a produção de álcool graxo pela diminuição da atividade do caminho da biossíntese de lipídeo competidor e pela diminuição da degradação de álcool graxo. Estes métodos e cepas hospedeiras são particularmente adequados para a produção de álcoois graxos dessaturados e seus derivados (por exemplo, acetatos de acila graxos), tais como feromônios de *Lepidoptera*.

[0011] Os ésteres graxos de acil-CoA com comprimento de cadeia carbônica diferente são sintetizados pelo complexo da acil-CoA graxa sintetase (FAS1 e 2) a partir de acetil-CoA e malonil-CoA e servem como substratos para a lipídeos de armazenagem e membrana. A reação inicial para lipídeos é a transferência de acil-CoAs graxas para glicerol-3-fosfato,

catalisada pela glicerol-3-fosfato 1-O-aciltransferase (GPAT) e resultando na formação de ácido lisofosfatídico. A superexpressão de GPAT em *Y. lipolytica* foi mostrada aumentar o acúmulo de lipídeo.

[0012] A levedura oleaginosa *Y. lipolytica* é conhecida ser capaz de utilizar compostos hidrofóbicos como álcoois graxos como a única fonte de energia e carbono. Álcoois graxos são considerados ser oxidados em aldeídos graxos pelas álcool graxo desidrogenases presentes tanto no ER quanto nos peroxissomas e álcool graxo oxidases (FAO) presentes nos peroxissomas. Os aldeídos graxos são oxidados ainda para ácidos graxos pelas aldeído graxo desidrogenases (HFD). Adh1p, Adh3p e Fao1p de *Y. lipolytica* foram sugeridos desempenhar um papel na degradação de álcoois graxos exógenos, enquanto os álcoois graxos resultantes da degradação de alcano foram sugeridos ser oxidados por Adh1p-Adh7p, Fadhp e Fao1p (Iwama, 2015). *Y. lipolytica* codifica quatro aldeído graxo desidrogenases, Hfd1p a Hfd4p, que foram mostradas ser essenciais para o crescimento nos *n*-alcanos (Iwama, 2014). O gene *PEX10* codifica o fator da biogênese de peroxissoma Peroxin 10. A deleção de *PEX10* em *Y. lipolytica* resulta na ausência de peroxissomas e em defeito na assimilação de *n*-decano (Sumita *et al*, 2002).

[0013] A presente invenção descreve a infrarregulagem da expressão de GPAT, Hfd1, Hfd4, Fao1 e/ou Pex10 como uma estratégia para redirecionar o fluxo de precursores de éster da acil-CoA graxa da síntese de lipídeo de armazenagem e membrana para a produção de álcool graxo. Em combinação com a introdução de dessaturases heterólogas e acil-CoA graxa redutases, isto permite a produção de álcoois graxos e derivados dos mesmos com altos títulos, em particular tais álcoois graxos e derivados que são compreendidos nos feromônios de *Lepidoptera*, em um célula de levedura oleaginosa tal como uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0014] É aqui provida uma célula de levedura oleaginosa capaz de produzir um álcool graxo dessaturada, a dita célula:

i) expressando pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressar pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) ter atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou ter atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia a um de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[0015] Também é provido um método de produção de um álcool graxo em uma célula de levedura oleaginosa, o dito método compreendendo as etapas de prover uma célula de levedura e incubar a dita célula de levedura em um meio, em que a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa, convertendo deste modo pelo menos parte da dita acil-CoA graxa para uma acil-CoA graxa dessaturada; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado, produzindo deste modo o dito álcool graxo dessaturado; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[0016] Também é provida uma construção de ácido nucleico para modificar uma célula de levedura, a dita construção compreendendo:

i) um primeiro polinucleotídeo codificando pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) um segundo polinucleotídeo codificando pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga (FAR), capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) opcionalmente, polinucleotídeos adicionais para reduzir a atividade de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10),

em que opcionalmente o primeiro polinucleotídeo e/ou o segundo polinucleotídeo e/ou os polinucleotídeos adicionais estão sob o controle de um promotor.

[0017] Também é provido um kit de partes compreendendo:

a) a célula de levedura como aqui definida e instruções para o uso; e/ou

b) uma construção de ácido nucleico como aqui definido, em que a dita construção é para modificar uma célula de levedura, e

c) opcionalmente a célula de levedura a ser modificada.

[0018] Também é provido um álcool graxo dessaturado, um acetato de acila graxo dessaturado ou um aldeído graxo dessaturado obtenível pelos métodos aqui divulgados.

[0019] Também é provido o uso de um álcool graxo dessaturado, um acetato de acila graxo dessaturado ou um aldeído graxo dessaturado obtenível pelos métodos aqui divulgados.

Descrição dos desenhos

[0020] Figura 1: caminho para Z9-C14:OAc. (1) tetradecanoil-CoA (miristoil-CoA), 14:CoA (2) (Z)9-tetradecen-1-il-CoA, Z9-14:CoA, (3) (Z)9-tetradecen-1-ol, Z9-14:OH, (4) acetato de (Z)9-tetradecen-1-ila, Z9-14:OAc, (5) (Z)9-tetradecenal, Z9-14:Ald. Δ^9 FAD – Z9-acila graxa dessaturase, FAR – acil-CoA graxa redutase, AcT – acetil-CoA transferase.

[0021] Figura 2: mapa de BB1963 (cassete marcador de seleção LEU2). Leu2 term.: terminador Leu2.

[0022] Figura 3: mapa de BB1360 (terminador *Pex10* e *lip2*). ECS: Sítio de Clonagem Fácil. *Pex10* term.: terminador *Pex10*. *lip2* term.: terminador *lip2*.

[0023] Figura 4: mapa de cassete de expressão de *Dmd9* e *HarFAR*. *pex20* term: terminador *pex20*. *TefI* prom.: promotor *Tefintron*. *lip2* term.; terminador *lip2*.

[0024] Figura 5: cassete de expressão de *Atf1*. *Atf1* IL códon opt: *Atf1* otimizado no códon para *Yarrowia lipolytica*

[0025] Figura 6: produção de álcoois graxos em várias cepas de *Y. lipolytica*; além do genótipo indicado no eixo X, as cepas também todas expressam a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* e a redutase de *Heliothis subflexa* (Hs_FAR). Sat.: álcoois graxos saturados (15:OH e 16:OH). Desat.: álcoois graxos dessaturados ((Z)9-16:OH e (Z)11-16:OH).

Descrição detalhada da invenção

Definições

[0026] Biopesticida: o termo “biopesticida” é uma contração de “pesticida biológico” e refere-se a diversos tipos de intervenção de controle de praga: através das relações predatórias, parasíticas, ou químicas. Na EU, os biopesticidas foram definidos como “uma forma de pesticida com base em micro-organismos ou produtos naturais”. Nos US, eles são definidos pelo EPA como “incluindo substâncias que ocorrem naturalmente que controlam

pragas (pesticidas bioquímicos), microorganismos que controlam pragas (pesticidas microbianos), e substâncias pesticidas produzidas pelas plantas contendo material genético adicionado (protetores incorporados em planta) ou PIPs”. A presente divulgação refere-se mais particularmente aos biopesticidas compreendendo produtos naturais ou substâncias que ocorrem naturalmente. Eles são tipicamente criados pelo cultivo e concentrando organismos que ocorrem naturalmente e/ou seus metabólitos incluindo bactérias e outros micróbios, fungos, nematóides, proteínas, etc. Eles são frequentemente considerados ser componentes importantes de programas de controle de praga integrados (IPM), e receberam muita atenção prática como substitutos para os produtos de proteção de planta química sintética (PPPs). O Manual of Biocontrol Agents (2009: antigamente o Biopesticide Manual) dá uma revisão dos produtos inseticidas biológicos disponíveis (e outro controle com base na biologia).

[0027] Dessaturado: o termo “dessaturado” será aqui usado intercambiavelmente com o termo “insaturado” e refere-se a um composto contendo uma ou mais ligações duplas ou triplas de carbono-carbono.

[0028] Ácido graxo: o termo “ácido graxo” refere-se a um ácido carboxílico tendo uma cadeia alifática longa, isto é uma cadeia alifática entre 4 e 28 átomos de carbono, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 átomos de carbono. A maioria dos ácidos graxos que ocorrem naturalmente são não ramificados. Eles podem ser saturados, ou dessaturados.

[0029] Acetato de acila graxa: o termo será aqui usado intercambiável com “acetato graxo” e refere-se a um acetato tendo uma cadeia carbônica graxa, isto é uma cadeia alifática entre 4 e 28 átomos de carbono, tais como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 átomos de carbono. Os acetatos de acila graxos podem ser saturados ou dessaturados.

[0030] Acil-CoA graxa: o termo será aqui usado intercambiável com “éster de acil-CoA graxa”, e refere-se a compostos da fórmula geral R-CO-SCoA, onde R é uma cadeia carbônica graxa. A cadeia carbônica graxa é unida ao grupo –SH da coenzima A por uma ligação de tioéster. As acil-CoA graxas podem ser saturadas ou dessaturadas, dependendo se o ácido graxo que é derivado de é saturado ou dessaturado.

[0031] Álcool graxo: o termo “álcool graxo” refere-se aqui a um álcool derivado de uma acil-CoA graxa, tendo um comprimento de cadeia carbônica de 4 a 28 átomos de carbono, tais como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 átomos de carbono. Os álcoois graxos podem ser saturados ou dessaturados.

[0032] Aldeído graxo: o termo refere-se aqui a um aldeído derivado de uma acil-CoA graxa, tendo um comprimento de cadeia carbônica de 4 a 28 átomos de carbono, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 átomos de carbono. Os aldeídos graxos podem ser saturados ou dessaturados.

[0033] Heterólogo: o termo “heterólogo” quando da alusão a um polipeptídeo, tal como uma proteína ou uma enzima, ou a um polinucleotídeo, deve ser aqui interpretado referir-se a um polipeptídeo ou um polinucleotídeo que não está naturalmente presente em uma célula do tipo selvagem. Por exemplo, o termo “ $\Delta 9$ dessaturase heteróloga” quando aplicada à *Yarrowia lipolytica* refere-se a uma $\Delta 9$ dessaturase que não está naturalmente presente em uma célula de *Y. lipolytica* tipo selvagem, por exemplo uma $\Delta 9$ dessaturase derivada de *Drosophila melanogaster*.

[0034] Nativo: o termo “nativo” quando da alusão a um polipeptídeo, tal como uma proteína ou uma enzima, ou a um polinucleotídeo, deve ser aqui interpretado referir-se a um polipeptídeo ou um polinucleotídeo que estejam naturalmente presentes em uma célula do tipo selvagem.

[0035] Praga: como aqui usado, o termo “praga” deve referir-se a um

organismo, em particular um animal, nocivo aos seres humanos ou interesses humanos, em particular no contexto de produção agrícola ou de criação. Uma praga é qualquer organismo vivo que é invasivo ou prolífico, nocivo, incômodo, pernicioso, destrutivo, um transtorno para as plantas ou animais, seres humanos ou interesses humanos, animais de criação, estruturas humanas, ecossistema selvagem etc. O termo frequentemente sobrepõe com os termos relacionados vermina, erva daninha, parasitas e patógenos vegetais e animais. É possível para um organismo ser uma praga em um cenário mas benéfico, domesticado ou aceitável em um outro.

[0036] Feromônio: feromônios são compostos que ocorrem naturalmente designados por uma cadeia alifática não ramificada (entre 9 e 18 carbonos) terminando em um grupo funcional álcool, aldeído ou acetato e contendo até 3 ligação duplas na cadeia principal alifática. As composições de feromônio podem ser produzidas química ou bioquimicamente, por exemplo como aqui descrito. Feromônios podem assim compreender álcoois graxos dessaturados, aldeídos graxos ou acetatos de acila graxos, tais como podem ser obtidos pelos métodos e células aqui descritos.

[0037] Atividade reduzida: o termo “atividade reduzida” pode referir-se aqui a uma perda total ou um parcial de atividade de um dado peptídeo, tal como uma proteína ou uma enzima. Em alguns casos, os peptídeos são codificados pelos genes essenciais, que não podem ser deletados. Nestes casos, a atividade do peptídeo pode ser reduzida pelos métodos conhecidos na técnica, tais como infra-regulagem de transcrição ou tradução, ou inibição do peptídeo. Em outros casos, o peptídeo é codificado por um gene não essencial, e a atividade pode ser reduzida ou pode ser completamente perdida, por exemplo como uma consequência de uma deleção do gene codificando o peptídeo.

[0038] Saturado: o termo “saturado” refere-se a um composto que é destituído de ligações de carbono-carbono.

[0039] A presente divulgação refere-se a uma célula de levedura oleaginosa útil para a produção de feromônios de *Lepidoptera*. Os inventores descobriram que a infra-regulagem de uma ou mais de *HFD1*, *HFD4*, *PEX10*, *FAO1* e *GPAT* em uma célula de levedura oleaginosa, em particular em uma célula de *Y. lipolytica*, combinada com a expressão heteróloga de pelo menos uma dessaturase heteróloga e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, resulta na produção de álcoois graxos dessaturados úteis por exemplo para formular composições de feromônio para o controle de praga. Em particular, a infra-regulagem de *PEX10* e uma ou mais de *HFD1*, *HFD4*, *FAO1* ou *GPAT* é de interesse. A célula pode ser engenheirada ainda para permitir também a produção de derivados de álcool graxo tais como aldeídos e acetatos, em particular derivados de álcool graxo dessaturados tais como aldeídos dessaturados e acetatos dessaturados, que também são úteis para tais composições de feromônio.

[0040] Em um aspecto, uma célula de levedura oleaginosa é provida, que é capaz de produzir um álcool graxo dessaturado, a dita célula:

i) expressar pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressar pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) tendo atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou tendo atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo

menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[0041] Em algumas modalidades, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) tem um mutação que resulta na atividade reduzida de Pex10 (SEQ ID NO: 8) e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou tendo um mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia a Pex10 (SEQ ID NO: 8) e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como

pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia a Pex10 (SEQ ID NO: 8) e pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[0042] Também é provido um método de produção de um álcool graxo em uma célula de levedura oleaginosa, o dito método compreendendo as etapas de prover uma célula de levedura e incubar a dita célula de levedura em um meio, em que a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa, convertendo deste modo pelo menos parte da dita acil-CoA graxa para uma acil-CoA graxa dessaturada; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado, produzindo deste modo o dito álcool graxo dessaturado; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID

NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[0043] Em algumas modalidades, as etapas do método de prover uma célula de levedura e incubar a dita célula de levedura em um meio, em que a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de Pex10 (SEQ ID NO: 8) e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou tem uma mutação que resulta na

atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia a Pex10 (SEQ ID NO: 8) e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia a Pex10 (SEQ ID NO: 8) e pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[0044] Também é provida uma construção de ácido nucleico para modificar uma célula de levedura, a dita construção compreendendo:

i) um primeiro polinucleotídeo codificando pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) um segundo polinucleotídeo codificando pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga (FAR), capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) opcionalmente, polinucleotídeos adicionais para reduzir a atividade de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO:

6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10),

em que opcionalmente o primeiro polinucleotídeo e/ou o segundo polinucleotídeo e/ou os polinucleotídeos adicionais estão sob o controle de um promotor.

[0045] Também é provido um kit de partes compreendendo uma célula de levedura como aqui descrita e instruções para o uso; e/ou uma construção de ácido nucleico como aqui descrita, em que a dita construção é para modificar uma célula de levedura, e opcionalmente uma célula de levedura a ser modificada.

[0046] Também é provido um álcool graxo dessaturado, um acetato de acila graxo dessaturado ou um aldeído graxo dessaturado obtenível pelos métodos aqui descritos.

[0047] Também é provido o uso de um álcool graxo dessaturado, um acetato de acila graxo dessaturado ou um aldeído graxo dessaturado obtenível pelos presentes métodos.

Dessaturase (FAD)

[0048] Na presente divulgação, os termos “acil-CoA graxa dessaturase”, “dessaturase”, “acila graxa dessaturase” e “FAD” serão usados intercambiavelmente. O termo refere-se a uma enzima capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla nas confirmações E/Z em uma acil-CoA tendo um comprimento de cadeia de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 átomos de carbono. A ligação dupla pode ser introduzida em qualquer posição. Por exemplo, uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 3 é chamada Δ^3 dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 5 é chamada Δ^5 dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 6 é chamada Δ^6 dessaturase. Uma

dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 7 é chamada $\Delta 7$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 8 é chamada $\Delta 8$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 9 é chamada $\Delta 9$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 10 é chamada $\Delta 10$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 11 é chamada $\Delta 11$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 12 é chamada $\Delta 12$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 13 é chamada $\Delta 13$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 14 é chamada $\Delta 14$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 15 é chamada $\Delta 15$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 16 é chamada $\Delta 16$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 17 é chamada $\Delta 17$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 18 é chamada $\Delta 18$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 19 é chamada $\Delta 19$ dessaturase. Uma dessaturase introduzindo uma ligação dupla na posição 20 é chamada $\Delta 20$ dessaturase.

[0049] As redutases reduzem as acil-CoAs em álcoois do comprimento de cadeia correspondente.

[0050] Em uma modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 5$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 6$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 7$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 8$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 9$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 10$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo

menos uma $\Delta 11$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 12$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 13$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 14$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 15$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 16$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 17$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 18$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 19$ dessaturase heteróloga. Em uma outra modalidade, a célula é capaz de expressar pelo menos uma $\Delta 20$ dessaturase heteróloga.

[0051] A pessoa versada saberá, dependendo de qual álcool graxo dessaturado é desejado, que tipo de dessaturase usar. Por exemplo, para a produção de um álcool graxo dessaturado na posição 11, uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2, uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura rosaceana* como apresentada na SEQ ID NO: 19 ou uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura parallela* como apresentada na SEQ ID NO: 20 podem ser usadas. Preferivelmente, uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2. Se um álcool graxo dessaturado na posição 9 é desejada, uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18 podem ser usadas. O gene codificando a dessaturase heteróloga pode ser

otimizado no códon para qualquer propósito para a célula hospedeira dada, por exemplo *Yarrowia lipolytica*, como é conhecido na técnica. Em uma modalidade, o ácido nucleico codificando a dessaturase heteróloga é como apresentado na SEQ ID NO: 63 ou um homólogo da mesma tendo pelo menos 60% de homologia a esta, tal como pelo menos 61% de homologia, tal como pelo menos 62% de homologia, tal como pelo menos 63% de homologia, tal como pelo menos 64% de homologia, tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 66% de homologia, tal como pelo menos 67% de homologia, tal como pelo menos 68% de homologia, tal como pelo menos 69% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 71% de homologia, tal como pelo menos 72%, tal como pelo menos 73%, tal como pelo menos 74%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99% de homologia com a SEQ ID NO: 63.

[0052] Consequentemente, em uma modalidade, a pelo menos uma dessaturase heteróloga é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2, tal como pelo menos 61% de homologia, tal como pelo menos 62% de homologia, tal como pelo menos 63% de homologia, tal como pelo menos 64% de homologia, tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 66% de homologia, tal como pelo menos 67% de homologia, tal como pelo menos 68% de homologia, tal como pelo menos

69% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 71% de homologia, tal como pelo menos 72%, tal como pelo menos 73%, tal como pelo menos 74%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2.

[0053] Em uma modalidade, a pelo menos uma dessaturase heteróloga é codificada por um ácido nucleico tendo pelo menos 60% de homologia com o ácido nucleico codificando a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 1, tal como pelo menos 61% de homologia, tal como pelo menos 62% de homologia, tal como pelo menos 63% de homologia, tal como pelo menos 64% de homologia, tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 66% de homologia, tal como pelo menos 67% de homologia, tal como pelo menos 68% de homologia, tal como pelo menos 69% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 71% de homologia, tal como pelo menos 72%, tal como pelo menos 73%, tal como pelo menos 74%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal

como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com o ácido nucleico codificando a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 1.

[0054] Em uma outra modalidade, a pelo menos uma dessaturase heteróloga é codificada por um ácido nucleico tendo pelo menos 60% de homologia com o ácido nucleico codificando a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 64, tal como pelo menos 61% de homologia, tal como pelo menos 62% de homologia, tal como pelo menos 63% de homologia, tal como pelo menos 64% de homologia, tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 66% de homologia, tal como pelo menos 67% de homologia, tal como pelo menos 68% de homologia, tal como pelo menos 69% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 71% de homologia, tal como pelo menos 72%, tal como pelo menos 73%, tal como pelo menos 74%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com o ácido nucleico codificando a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 64.

[0055] Em uma outra modalidade, a pelo menos uma dessaturase

heteróloga é uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18, tal como pelo menos 61% de homologia, tal como pelo menos 62% de homologia, tal como pelo menos 63% de homologia, tal como pelo menos 64% de homologia, tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 66% de homologia, tal como pelo menos 67% de homologia, tal como pelo menos 68% de homologia, tal como pelo menos 69% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 71% de homologia, tal como pelo menos 72%, tal como pelo menos 73%, tal como pelo menos 74%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18.

[0056] Em uma modalidade, a pelo menos uma dessaturase heteróloga é codificada por um ácido nucleico tendo pelo menos 60% de homologia com o ácido nucleico codificando a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 17, tal como pelo menos 61% de homologia, tal como pelo menos 62% de homologia, tal como pelo menos 63% de homologia, tal como pelo menos 64% de homologia, tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 66% de homologia, tal como pelo menos 67% de homologia, tal como pelo menos 68% de homologia, tal

como pelo menos 69% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 71% de homologia, tal como pelo menos 72%, tal como pelo menos 73%, tal como pelo menos 74%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com o ácido nucleico codificando $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 17.

[0057] Em uma outra modalidade, a pelo menos uma dessaturase heteróloga é codificada por um ácido nucleico tendo pelo menos 60% de homologia com o ácido nucleico codificando a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 63, tal como pelo menos 61% de homologia, tal como pelo menos 62% de homologia, tal como pelo menos 63% de homologia, tal como pelo menos 64% de homologia, tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 66% de homologia, tal como pelo menos 67% de homologia, tal como pelo menos 68% de homologia, tal como pelo menos 69% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 71% de homologia, tal como pelo menos 72%, tal como pelo menos 73%, tal como pelo menos 74%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos

83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com o ácido nucleico codificando $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 63.

[0058] A dessaturase heteróloga pode preferivelmente ser derivada de um inseto, por exemplo da ordem de *Lepidoptera*. Em uma modalidade, a dessaturase heteróloga é derivada de *Amyelois transitella*. Em uma outra modalidade, a dessaturase heteróloga é derivada de *Helicoverpa assulta*. Em uma outra modalidade, a dessaturase heteróloga é derivada de *Helicoverpa armigera*. Em uma outra modalidade, a dessaturase heteróloga é derivada de *Choristoneura rosaceana*. Em uma outra modalidade, a dessaturase heteróloga é derivada de *Choristoneura parallela*.

[0059] Uma dessaturase heteróloga pode ser expressa a partir de um ácido nucleico introduzido na célula, por exemplo em um vetor tal como um plasmídeo, ou pela integração genômica. O ácido nucleico pode ser otimizado no códon para qualquer propósito como é conhecido na técnica para a célula de levedura específica usada.

[0060] A célula de levedura a ser modificada pode expressar uma dessaturase nativa, que pode ter um impacto sobre a produção de álcool graxo dessaturado e/ou acetato de acila graxo dessaturado. Conseqüentemente, se a célula de levedura a ser modificada expressa uma tal dessaturase nativa, a célula pode ser modificada de modo que a atividade da dessaturase nativa é reduzida ou ausente.

[0061] Para garantir a falta de atividade de uma dessaturase nativa,

métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados. O gene codificando a dessaturase nativa pode ser deletado ou parcialmente deletado de modo a garantir que a dessaturase nativa não seja expressa. Alternativamente, o gene pode ser mutado de modo que a dessaturase nativa seja expressa mas falte atividade, por exemplo pela mutação do sítio catalítico da enzima. Alternativamente, a tradução de mRNA para uma proteína ativa pode ser prevenida pelos métodos tais como RNA silenciador ou siRNA. Alternativamente, a célula de levedura pode ser incubada em um meio compreendendo um inibidor que inibe a atividade da dessaturase nativa. Um composto inibindo a transcrição do gene codificando a dessaturase nativa também pode ser provido de modo que a transcrição é inativada quando o dito composto está presente.

[0062] A inativação da dessaturase nativa pode assim ser permanente ou de longa duração, isto é a célula de levedura modificada não exibe a atividade da dessaturase nativa em condições estáveis, ou a mesma pode ser transitória, isto é a célula de levedura modificada pode exibir atividade da dessaturase nativa durante períodos de tempo, mas esta atividade pode ser suprimida durante outros períodos de tempo.

[0063] *Acil-CoA graxa redutase que forma álcool (EC 1.2.1.84)*

[0064] Os termos “acil-CoA graxa redutase que forma álcool”, “acil-CoA graxa redutase” e “FAR” serão aqui usados intercambiável. O termo “FAR heteróloga” refere-se a uma FAR que não é naturalmente expressa pela célula de levedura.

[0065] FARs catalisa a reação de duas etapas (figura 1):



[0066] em que em uma primeira etapa, a acil-CoA graxa é reduzida para um aldeído graxo, antes que o aldeído graxo seja reduzido ainda para um álcool graxo em uma segunda etapa. A acil-CoA graxa pode ser uma acil-CoA graxa dessaturada.

[0067] As FARs capazes de catalisar tal reação são a acil-CoA graxa redutase que forma álcoois com um número EC 1.2.1.84. A célula de levedura da presente divulgação expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa como descrito acima, e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado, e tenha além disso atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou tendo atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10). Em algumas modalidades, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga, pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga e tem atividade reduzida de Pex10 e pelo menos

uma de Hfd1, Hfd4, GPAT e Fao1 ou um homólogo dos mesmos.

[0068] Em algumas modalidades, a pelo menos uma FAR heteróloga é derivada de um organismo pertencente à ordem *Lepidoptera*.

[0069] Uma acil-CoA graxa redutase heteróloga pode ser expressa a partir de um ácido nucleico introduzido na célula, por exemplo em um vetor tal como um plasmídeo, ou pela integração genômica. O ácido nucleico pode ser otimizado no códon para qualquer propósito como é conhecido na técnica para a célula de levedura específica usada.

[0070] Em uma modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 3$ acil-CoA graxa para um $\Delta 3$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 5$ acil-CoA graxa para um $\Delta 5$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 6$ acil-CoA graxa para um $\Delta 6$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 7$ acil-CoA graxa para um $\Delta 7$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 8$ acil-CoA graxa para um $\Delta 8$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 9$ acil-CoA graxa para um $\Delta 9$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 10$ acil-CoA graxa para um $\Delta 10$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 11$ acil-CoA graxa para um $\Delta 11$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 12$ acil-CoA graxa para um $\Delta 12$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 13$ acil-CoA graxa para um $\Delta 13$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 14$ acil-CoA graxa para um $\Delta 14$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 15$

acil-CoA graxa para um $\Delta 15$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 16$ acil-CoA graxa para um $\Delta 16$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 17$ acil-CoA graxa para um $\Delta 17$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 18$ acil-CoA graxa para um $\Delta 18$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 19$ acil-CoA graxa para um $\Delta 19$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 20$ acil-CoA graxa para um $\Delta 20$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 21$ acil-CoA graxa para um $\Delta 21$ álcool graxo. Em uma outra modalidade, a pelo menos uma FAR heteróloga é capaz de converter uma $\Delta 22$ acil-CoA graxa para um $\Delta 22$ álcool graxo.

[0071] Em algumas modalidades, a FAR é selecionada de uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR derivada de *Helicoverpa armigera*, como apresentada na SEQ ID NO: 14, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24. Preferivelmente, a FAR é selecionada de uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR derivada de *Helicoverpa armigera* e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12.

[0072] Em uma modalidade, a FAR é Har_FAR (SEQ ID NO: 14, FAR de *Helicoverpa armigera*) ou uma variante da mesma tendo pelo menos 75% de homologia com a Har_FAR, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como

pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com a Har_FAR (SEQ ID NO: 14).

[0073] Em uma outra modalidade, a FAR é Has_FAR (SEQ ID NO: 16, FAR de *Helicoverpa assulta*) ou uma variante da mesma tendo pelo menos 75% de homologia com a Has_FAR, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com a Has_FAR (SEQ ID NO: 16).

[0074] Em uma outra modalidade, a FAR é Hs_FAR (SEQ ID NO: 12, FAR de *Heliothis subflexa*) ou uma variante da mesma tendo pelo menos 75% de homologia com a Hs_FAR, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo

menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com a Hs_FAR (SEQ ID NO: 12).

[0075] Em uma outra modalidade, a FAR é Ban_FAR (SEQ ID NO: 24, FAR de *Bicyclus anynana*) ou uma variante da mesma tendo pelo menos 75% de homologia com a Ban_FAR, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com a Ban_FAR (SEQ ID NO: 24).

[0076] Em algumas modalidades, a expressão da dessaturase e/ou da FAR pode ser induzida, por exemplo se os genes codificando estas enzimas estão sob o controle de promotores indutíveis, como é conhecido na técnica. A célula de levedura é incubada sob condições adequadas, tais como em um meio apropriado e em uma temperatura apropriada como é conhecido por uma pessoa versada na técnica. Os meios adequados que sustentam o crescimento da levedura são conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados a: meio indefinido, completo tal como YEPD (ou YPD, Extrato de Levedura Peptona Dextrose); meio definido, completo tal como SC (Completo sintético); meio definido, de desprendimento tal como SD (Dextrose Sintética) faltando um ou mais elementos tais como um aminoácido ou um indutor; ou meio mineral, consistindo em sais, vitaminas e uma fonte de carbono, e outros.

Atividade reduzida de Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1, GPAT ou um homólogo dos mesmos

[0077] Por toda esta divulgação, o termo “atividade reduzida” pode referir-se a uma atividade parcial ou totalmente perdida. A atividade reduzida pode ser obtida pelos métodos conhecidos na técnica, por exemplo pela mutação ou deleção do gene codificando o peptídeo que apresenta a dita atividade, pela repressão de transcrição usando um promotor repressível, pela inibição da atividade ou pelo silenciamento ao nível de tradução.

Fator de biogênese de peroxissoma 10 Pex10

[0078] Na *Yarrowia lipolytica*, *PEX10* (YALI0C01023g, SEQ ID NO: 7) codifica o fator de biogênese de peroxissoma 10 (SEQ ID NO: 8). O mesmo está envolvido na importação de proteínas da matriz de peroxissoma e localiza para a membrana peroxissômica.

[0079] Os inventores descobriram que a atividade reduzida de Pex10 resultou em títulos aumentados de álcoois graxos dessaturados na *Y. lipolytica*.

[0080] Consequentemente, a célula de levedura oleaginosa da presente divulgação expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa como descrita acima, pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado como descrito acima, e tem atividade reduzida de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de

homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para um de Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0081] Redução ou perda total da atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para esta podem ser obtidas pelos métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, a atividade reduzida é a perda total de atividade. Por exemplo, o gene codificando Pex10 ou a proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas podem ser nocauteados, ou deletados, ou a sua transcrição pode ser prevenida como é conhecido na técnica, por exemplo pela introdução de um promotor repressível a montante do gene que resulta na inativação total de transcrição na presença de um composto repressor.

[0082] Em algumas modalidades, o gene codificando Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas é deletada. Em uma modalidade, o gene é *PEX10* (SEQ ID NO: 7) e a célula de levedura oleaginoso é *Yarrowia lipolytica*.

[0083] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2, uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18, uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura rosaceana* como apresentada na SEQ ID

NO: 19 e uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura parallela* como apresentada na SEQ ID NO: 20; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; preferivelmente, a FAR é selecionada de uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR derivada de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal

como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0084] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:

pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0085] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:

pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo

pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0086] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:

pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos

83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0087] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como

pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0088] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:

pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0089] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:

pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0090] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:

pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de

homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0091] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e
pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e
tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo

menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[0092] Em modalidades preferidas, a célula de levedura é uma célula de *Yarrowia*, tal como um célula de *Yarrowia lipolytica*.

Aldeído graxo desidrogenase Hfd1

[0093] Na *Yarrowia lipolytica*, *HFD1* (YALI0F23793g, SEQ ID NO: 3) codifica uma aldeído graxo desidrogenase (SEQ ID NO: 4). A mesma catalisa a oxidação de aldeídos graxos para ácido graxos.

[0094] Os inventores descobriram que a atividade reduzida de Hfd1 resultou em título aumentado de álcoois graxos dessaturados em células de levedura oleaginosas tais como *Y. lipolytica*. Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[0095] Consequentemente, a célula de levedura oleaginosa da presente divulgação expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa como descrito acima, pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado como descrito acima, e tem atividade reduzida de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de

homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[0096] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[0097] A atividade reduzida de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas pode ser obtida pelos métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, a atividade reduzida é a perda total de atividade. Por exemplo, o gene codificando Hfd1 ou a proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas podem ser nocauteados, ou deletados, ou a sua transcrição pode ser prevenida como é conhecido na técnica, por exemplo pela introdução de um promotor repressível a montante do gene que resulta na total inativação da transcrição na presença de um composto de repressão.

[0098] Em algumas modalidades, o gene codificando Hfd1 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas são deletados. Em uma modalidade, o gene é *HFD1* (SEQ ID NO: 3) e a célula de levedura oleaginosa é *Yarrowia lipolytica*.

[0099] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada

na SEQ ID NO: 2, uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18, uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura rosaceana* como apresentada na SEQ ID NO: 19 e uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura parallela* como apresentada na SEQ ID NO: 20; preferivelmente a pelo menos uma dessaturase heteróloga é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2 ou uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; preferivelmente, a FAR é selecionada de uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR derivada de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos

83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00100] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8).

[00101] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:

pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de

homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00102] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00103] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como

pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00104] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00105] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00106] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00107] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00108] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como

descrito acima.

[00109] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00110] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00111] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60%

de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

 pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

 tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00112] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00113] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
 pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

 pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo

pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00114] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00115] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd1 ou

de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 (SEQ ID NO: 4).

[00116] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

Aldeído graxo desidrogenase Hfd4

[00117] Na *Yarrowia lipolytica*, *HFD4* (YALI0B01298g, SEQ ID NO: 5) codifica uma aldeído graxo desidrogenase (SEQ ID NO: 6). A mesma catalisa a oxidação de aldeídos graxos para ácido graxos.

[00118] Os inventores descobriram que a atividade reduzida de Hfd4 resultou em título aumentado de álcoois graxos dessaturados na *Y. lipolytica*. Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00119] Consequentemente, a célula de levedura oleaginosa da

presente divulgação expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa como descrito acima, pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado como descrito acima, e tem atividade reduzida de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00120] Atividade reduzida de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas pode ser obtida pelos métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, a atividade reduzida é a perda total de atividade. Por exemplo, o gene codificando Hfd4 ou a proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas podem ser nocauteados, ou deletados, ou a sua transcrição pode ser prevenida como é conhecido na técnica, por exemplo pela introdução de um promotor repressível a montante do gene que resulta na inativação total de transcrição na presença de um composto repressor.

[00121] Em algumas modalidades, o gene codificando Hfd4 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas são deletados. Em uma modalidade, o gene é *HFD4* (SEQ ID NO: 5) e a célula de levedura oleaginosa é *Yarrowia lipolytica*.

[00122] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2, uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18, uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura rosaceana* como apresentada na SEQ ID NO: 19 e uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura parallela* como apresentada na SEQ ID NO: 20; preferivelmente a pelo menos uma dessaturase heteróloga é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2 ou uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; preferivelmente, a FAR é selecionada de uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR derivada de *Helicoverpa armigera* como

apresentada na SEQ ID NO: 14 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00123] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00124] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:

pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00125] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00126] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal

como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00127] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00128] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo

menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00129] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00130] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de

homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00131] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00132] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como

pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00133] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00134] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00135] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00136] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00137] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como

descrito acima.

[00138] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Hfd4 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 (SEQ ID NO: 6).

[00139] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00140] Em modalidades preferidas, a célula de levedura é uma célula de *Yarrowia*, tal como uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

Álcool graxo oxidase Fao1

[00141] Na *Yarrowia lipolytica*, FAO1 (YALI0B14014g, SEQ ID NO: 21) codifica uma álcool graxo oxidase (SEQ ID NO: 22). A sua deleção resulta no acúmulo aumentado de ω -hidróxi ácido graxos.

[00142] Os inventores descobriram que a atividade reduzida de Fao1 resultou em título aumentado de álcoois graxos dessaturados na *Y. lipolytica*. Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00143] Consequentemente, a célula de levedura oleaginosa da presente divulgação expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa como descrito acima, pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado como descrito acima, e tem atividade reduzida de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos

98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para um de Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00144] Atividade reduzida de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas pode ser obtida pelos métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, a atividade reduzida é a perda total de atividade. Por exemplo, o gene codificando Fao1 ou a proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas podem ser nocauteados, ou deletados, ou a sua transcrição pode ser prevenida como é conhecido na técnica, por exemplo pela introdução de um promotor repressível a montante do gene que resulta na inativação total de transcrição na presença de um composto repressor.

[00145] Em algumas modalidades, o gene codificando Fao1 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas é deletado. Em uma modalidade, o gene é Fao1 (SEQ ID NO: 21) e a célula de levedura oleaginoso é *Yarrowia lipolytica*.

[00146] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2, uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18, uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura rosaceana* como apresentada na SEQ ID NO: 19 e uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura parallela* como apresentada na SEQ ID NO: 20; preferivelmente a pelo menos uma dessaturase heteróloga é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2 ou uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de

Drosophila melanogaster como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; preferivelmente, a FAR é selecionada de uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR derivada de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00147] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00148] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00149] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como

descrito acima.

[00150] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00151] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00152] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60%

de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00153] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00154] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo

pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00155] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00156] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou

de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00157] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00158] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de

homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00159] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00160] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como

pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00161] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00162] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos

92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22).

[00163] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00164] Em modalidades preferidas, a célula de levedura é uma célula de *Yarrowia*, tal como uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

Glicerol-3-fosfato aciltransferase GPAT

[00165] Na *Yarrowia lipolytica*, GPAT (YALI0C00209g, SEQ ID NO: 9) codifica uma glicerol-3-fosfato aciltransferase (SEQ ID NO: 10). GPAT catalisa a primeira reação para a biossíntese de glicerolípídeos. O gene é essencial na *Yarrowia lipolytica*.

[00166] Os inventores descobriram que a atividade reduzida de Fao1 resultou em título aumentado de álcoois graxos dessaturados na *Y. lipolytica*. Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00167] Consequentemente, a célula de levedura oleaginosa da presente divulgação expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa como descrito acima, pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado como descrito acima, e tem atividade reduzida de Fao1 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a GPAT (SEQ ID

NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para um de GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00168] A atividade reduzida de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas pode ser obtida pelos métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, a atividade reduzida é a perda parcial de atividade. Por exemplo, o gene codificando GPAT ou a proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas podem ser mutados ou a sua transcrição pode ser reduzida como é conhecido na técnica, por exemplo pela introdução de um promotor repressível a montante do gene que resulta na inativação parcial da transcrição na presença de um composto repressor. Se a célula de levedura é *Yarrowia lipolytica*, a atividade de GPAT é reduzida sem deletar o gene.

[00169] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2, uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia

com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18, uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura rosaceana* como apresentada na SEQ ID NO: 19 e uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura parallela* como apresentada na SEQ ID NO: 20; preferivelmente a pelo menos uma dessaturase heteróloga é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2 ou uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga selecionada a partir do grupo que consiste em uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16, uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; preferivelmente, a FAR é selecionada de uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR derivada de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14 e uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo

menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00170] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00171] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de

homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00172] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00173] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como

pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00174] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00175] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00176] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00177] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00178] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como

descrito acima.

[00179] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00180] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00181] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60%

de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

 pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

 tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00182] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00183] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
 pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2; e

 pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo

pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00184] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00185] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa:
pelo menos uma dessaturase heteróloga tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18; e

pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24; e

tem atividade reduzida ou perda total de atividade de GPAT ou

de uma proteína tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00186] Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00187] Em modalidades preferidas, a célula de levedura é uma célula de *Yarrowia*, tal como uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

Redução de atividade de duas ou mais de Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT

[00188] Pode ser vantajoso reduzir a atividade de mais do que uma das proteínas listadas acima. Em algumas modalidades, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima, e de uma ou mais de Hfd1, Hfd4, Fao1 e GPAT, ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos

81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4, com a Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6, com a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

[00189] Consequentemente, em algumas modalidades a célula de levedura tem atividade reduzida de duas ou mais de Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT, ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4, a

Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6, a Pex10 como apresentada na SEQ ID NO: 8, com a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

[00190] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1 e Hfd4 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4 ou Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6.

[00191] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1 e Pex10 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de

homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4 ou a Pex10 como apresentada na SEQ ID NO: 8.

[00192] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1 e Fao1 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4 ou a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22.

[00193] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo

menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

[00194] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd4 e Pex10 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal

como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6 ou a Pex10 como apresentada na SEQ ID NO: 8.

[00195] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd4 e Fao1 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6 ou a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22.

[00196] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd4 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo

menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

[00197] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Pex10 e Fao1 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como

pelo menos 99% de homologia com a Pex10 como apresentada na SEQ ID NO: 8 ou a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22.

[00198] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Pex10 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 como apresentada na SEQ ID NO: 8 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

[00199] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Fao1 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos

86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

[00200] Em outras modalidades a célula de levedura tem atividade reduzida de três ou mais de Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT, ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4, com a Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6, com a Pex10 como apresentada na SEQ ID NO: 8, com a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

[00201] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos

uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Hfd4 e Pex10 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00202] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Hfd4 e Fao1 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00203] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Hfd4 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00204] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Pex10 e Fao1 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00205] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Pex10 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00206] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Fao1 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00207] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd4, Pex10 e Fao1 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00208] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd4, Pex10 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00209] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd4, Fao1 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00210] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Pex10, Fao1 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00211] Em outras modalidades a célula de levedura tem atividade reduzida de quatro ou mais de Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT, ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de

homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4, com a Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6, com a Pex10 como apresentada na SEQ ID NO: 8, com a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

[00212] Em uma modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Hfd4, Pex10 e Fao1 ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00213] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Hfd4, Pex10 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00214] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Pex10, Fao1 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00215] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd1, Hfd4, Fao1 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65%

de homologia com estas.

[00216] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga como descrita acima e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase como descrita acima, e tem atividade reduzida de Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas.

[00217] Em outras modalidades a célula de levedura tem atividade reduzida de todas de Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT, ou homólogos das mesmas tendo pelo menos 65% de homologia com estas, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Hfd1 como apresentada na SEQ ID NO: 4, com a Hfd4 como apresentada na SEQ ID NO: 6, com a Pex10 como apresentada na SEQ ID NO: 8, com a Fao1 como apresentada na SEQ ID NO: 22 ou com a GPAT como apresentada na SEQ ID NO: 10.

Acetiltransferase (EC 2.3.1.84)

[00218] O termo “acetiltransferase” refere-se às enzimas de número EC 2.3.1.84 e também pode ser chamada “álcool-O-acetiltransferase” ou “AcT”. A mesma atua sobre álcoois alifáticos, e catalisa a reação:

[00219] Acetil-CoA + um álcool \rightleftharpoons CoA + um éster acetílico.

[00220] A célula de levedura da presente divulgação pode expressar ou superexpressar uma acetiltransferase. A acetiltransferase pode ser uma acetiltransferase nativa que a célula a ser modificada já é capaz de expressar, ou a mesma pode ser uma acetiltransferase heteróloga. Se a célula de levedura expressa uma acetiltransferase nativa, a célula de levedura é preferivelmente modificada de modo que a expressão da acetiltransferase nativa é aumentada. Isto pode ser feito pelos métodos conhecidos na técnica, tais como mas não limitados à introdução de cópias adicionais do ácido nucleico codificando a acetiltransferase no genoma ou em um vetor, modificação do promotor para um promotor constitutivo com um alto nível de expressão, ou para um promotor indutível que na indução leva aos altos níveis de expressão. Uma acetiltransferase heteróloga pode ser expressa a partir de um ácido nucleico introduzido na célula, por exemplo em um vetor tal como um plasmídeo, ou pela integração genômica. O ácido nucleico pode ser otimizado no códon para qualquer propósito como é conhecido na técnica para a célula de levedura específica usada.

[00221] Se a célula de levedura não expressa uma acetiltransferase nativa, um ácido nucleico codificando uma acetiltransferase heteróloga pode ser introduzido na célula, em uma localização genômica ou em um vetor, para permitir a expressão da acetiltransferase. Preferivelmente, a acetiltransferase é expressa em um nível alto, por exemplo pela introdução de cópias múltiplas do ácido nucleico codificando a acetiltransferase, ou levando-se a vantagem de um promotor constitutivo com um alto nível de expressão, ou de um promotor indutível que na indução leva a altos níveis de expressão.

[00222] O termo “superexpressa” refere-se assim à superexpressão de uma acetiltransferase em uma célula de levedura quando comparada com uma célula de levedura que não foi modificada para superexpressar a acetiltransferase, isto é a cepa precursora.

[00223] Em algumas modalidades, a acetiltransferase é a AcT da SEQ ID NO: 62 (Atf1, a AcT da *S. cerevisiae*) ou uma variante da mesma tendo pelo menos 75% de homologia com a Atf1 de Sc, tal como pelo menos 76%, tal como pelo menos 77%, tal como pelo menos 78%, tal como pelo menos 79%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 81%, tal como pelo menos 82%, tal como pelo menos 83%, tal como pelo menos 84%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 86%, tal como pelo menos 87%, tal como pelo menos 88%, tal como pelo menos 89%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 100% de homologia com a SEQ ID NO: 62.

[00224] Em outras modalidades, a conversão de pelo menos parte dos álcoois graxos dessaturados para acetatos de acila graxos dessaturados é feita quimicamente, como é conhecido pela pessoa versada. Por exemplo, cloreto de acetila pode ser adicionado ao álcool graxo e a mistura incubada na temperatura ambiente depois de misturar.

Produção de compostos de feromônio

[00225] As células de levedura da presente divulgação podem ser usadas para a produção de compostos que estão naturalmente compreendidos dentro dos feromônios, em particular feromônios de *Lepidoptera*. Tais compostos tipicamente não são naturalmente produzidos pelas células de levedura oleaginosas.

[00226] Os compostos de feromônio compreendem álcoois graxos dessaturados e saturados, acetatos de acila graxos dessaturados e saturados, e aldeídos graxos dessaturados e saturados. Preferivelmente, os compostos produzidos pelas células e métodos da presente divulgação são dessaturados.

[00227] Os compostos obteníveis pelos presentes métodos usando as presentes células podem ser compostos de feromônio que ocorrem

naturalmente de várias espécies de *Lepidoptera*. As larvas de muitas espécies de lepidóptero são pragas principais na agricultura. Algumas das pragas principais incluem *Tortricidae*, *Noctuidae*, e *Pyralidae*. As larvas dos gêneros *Noctuidae*, *Spodoptera* (lagartas), *Helicoverpa* (caruncho da espiga do milho), ou *Pieris brassicae* podem causar dano extensivo a certas safras. As larvas de *Helicoverpa zea* (lagartas da cápsula do algodão ou lagartas da fruta de amato) são polípagos, significando que elas comem uma variedade de safras, incluindo tomates e algodão.

[00228] Em algumas modalidades, os compostos obteníveis pelos presentes métodos usando as presentes células podem ser compostos de feromônio que ocorrem naturalmente dos gêneros *Tortricidae*, *Noctuidae*, e *Pyralidae*. Por exemplo, os compostos são de ocorrência natural em *Spodoptera* ou *Helicoverpa*. Em algumas modalidades, os compostos são de ocorrência natural em *Tuta absoluta* (traça do tomate), *Lobesia botrana* (traça da videira), *Ectomyelois ceratoniae* (traça de alfarroba) ou *Epiphyas postvittana* (traça da maçã marrom clara).

Produção de álcoois graxos dessaturados

[00229] As células de levedura da presente divulgação podem ser usadas para a produção de álcoois graxos dessaturados. Tais compostos são naturalmente compreendidos dentro dos feromônios, em particular feromônios de *Lepidoptera*, como detalhado acima.

[00230] A presente célula de levedura oleaginosa expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de

homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10). Em modalidades específicas, a célula de levedura também tem atividade reduzida ou perda total de atividade de Pex10 ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8), como descrito acima.

[00231] Consequentemente, é aqui provido um método para produzir um álcool graxo dessaturado em uma célula de levedura oleaginosa, o dito método compreendendo as etapas de prover uma célula de levedura e incubar a dita célula de levedura em um meio, em que a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa, convertendo deste modo pelo menos parte da dita acil-CoA graxa para uma acil-CoA graxa dessaturada; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase

heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado, produzindo deste modo o dito álcool graxo dessaturado; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00232] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8) e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00233] A célula de levedura, a dessaturase, a acil-CoA graxa redutase,

Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT ou homólogos das mesmas podem ser como aqui definidos em outro lugar.

[00234] Os álcoois graxos produzidos por tais métodos podem ser saturados ou dessaturados. Geralmente, álcoois graxos dessaturados são mais desejáveis, e é um objetivo da presente divulgação prover métodos para a obtenção de álcoois graxos dessaturados e derivados dos mesmos com um alto título.

[00235] A célula de levedura da presente divulgação pode assim ser usada para a produção de uma faixa de álcoois graxos dessaturados, tais como:

(Z)- Δ 3 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 ;

(E)- Δ 3 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 5 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 ;

(E)- Δ 5 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 6 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 6 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 7 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 7 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 8 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 8 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de

cadeia carbônica de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 9 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 9 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 10 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 10 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 11 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 11 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 12 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 12 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 13 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22; e

(*E*)- Δ 13 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[00236] Em uma modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 8. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 9. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 10. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 11. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 12. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 13. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 14. Em uma outra

modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 15. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 16. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 17. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 18. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 19. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 20. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 21. Em uma outra modalidade, o álcool graxo tem um comprimento de cadeia de 22.

[00237] A célula de levedura aqui divulgada pode assim expressar uma $\Delta 9$ dessaturase heteróloga e uma acil-CoA graxa redutase, e ser usada para produzir álcoois graxos abrigando uma dessaturação na conformação Z na posição 9, por exemplo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14 ((Z)9-14:OH). Este álcool graxo é um precursor de (Z)9-C14:OAc, que é um componente importante de feromônios derivados de várias espécies, por exemplo a lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda*.

[00238] Em outras modalidades, a célula de levedura expressa uma $\Delta 11$ dessaturase heteróloga e uma acil-CoA graxa redutase, e pode ser usada para produzir álcoois graxos abrigando uma dessaturação na conformação Z na posição 9. Por exemplo, (Z)11-C14:OH pode ser produzido, isto é um álcool graxo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14 abrigando uma dessaturação na conformação Z na posição 9. Este álcool graxo é um precursor de (Z)11-C14:OAc, que é um componente importante de feromônios derivados de várias espécies, por exemplo o furador do milho europeu *Ostrinia nubilalis* e o enrolador de folha de faixa vermelha *Argyrotaenia velutinana*.

[00239] A célula de levedura aqui divulgada pode assim expressar uma $\Delta 11$ dessaturase heteróloga, uma acil-CoA graxa redutase, e acetiltransferase e ser usada para produzir acetatos de álcool graxo abrigando uma

dessaturação na conformação Z na posição 11, por exemplo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 16 ((Z)11-16:OH). Este álcool graxo pode ser oxidado em (Z)11-16:Ald, que é um componente importante dos feromônios derivados de várias espécies, por exemplo a lagartas da cápsula do algodão *Helicoverpa armigera*.

[00240] Em outras modalidades, a célula de levedura expressa uma $\Delta 11$ dessaturase heteróloga e uma acil-CoA graxa redutase, e pode ser usada para produzir álcoois graxos abrigando uma dessaturação na conformação E na posição 9. Por exemplo, (E)11-C14:OH pode ser produzido, isto é um álcool graxo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14 abrigando uma dessaturação na conformação E na posição 9. Este álcool graxo é um precursor de (E)11-C14:OAc, que é um componente importante de feromônios derivados de várias espécies, por exemplo a traça da maçã marrom claro *Epiphyas postvittana*.

[00241] Os álcoois graxos dessaturados produzidos pela presente célula de levedura também podem ser dessaturados em mais do que uma posição. Os álcoois graxos dessaturados podem ser dessaturados em pelo menos duas posições, tal como pelo menos três posições, tal como quatro posições.

[00242] Por exemplo, os álcoois graxos dessaturados (E)7, (Z)9 podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22. Os álcoois graxos dessaturados (E)3, (Z)8, (Z)11 podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, por exemplo 14. Os álcoois graxos dessaturados (Z)9, (E)11, (E)13 podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[00243] Os álcoois graxos dessaturados assim produzidos podem ser modificados ainda como é conhecido na técnica, por exemplo pelo encurtamento da cadeia carbônica.

[00244] Em algumas modalidades, os álcoois graxos dessaturados (E)7,

(Z)9 podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22. Em outras modalidades, os álcoois graxos dessaturados (E)3, (Z)8, (Z)11 podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22. Já em outra modalidade, os álcoois graxos dessaturados (Z)9, (E)11, (E)13 podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

Produção de um acetato de acila graxo dessaturado

[00245] Os acetatos de acila graxos, em particular acetatos de acila graxos dessaturados, também são naturalmente compreendidos dentro dos feromônios, em particular feromônios produzidos pelas espécies pertencentes à ordem *Lepidoptera*. As células de levedura e métodos da presente divulgação também podem ser usados para se obter tais acetatos de acila graxos.

[00246] Isto pode ser feito pela introdução de um gene codificando uma acetiltransferase, como detalhado acima, ou pode ser feito pelos métodos dos produtos químicos, como são conhecidos pela pessoa versada. Por exemplo, cloreto de acetila pode ser adicionado ao álcool graxo e a mistura incubada na temperatura ambiente depois de misturar.

[00247] A célula de levedura da presente divulgação pode opcionalmente expressar ou superexpressar uma acetiltransferase capaz de converter pelo menos parte dos álcoois graxos dessaturados produzidos pela célula em acetatos de acila graxos dessaturados, e pode assim ser usada para a produção de uma faixa de acetatos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, tal como:

(Z)- Δ^3 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 ;

(E)- Δ^3 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de

cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 5 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 5 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 6 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 6 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 7 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 7 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 8 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 8 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 9 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 9 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 10 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 10 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 11 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 11 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 12 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(E)- Δ 12 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(Z)- Δ 13 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22; e

(E)- Δ 13 dessaturada acetato graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[00248] Em uma modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 8. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 9. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 10. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 11. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 12. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 13. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 14. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 15. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 16. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 17. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 18. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 19. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 20. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 21. Em uma outra modalidade, o acetato de acila graxo tem um comprimento de cadeia de 22.

[00249] Consequentemente, em uma modalidade, a célula de levedura expressa uma Δ 9 dessaturase heteróloga, uma FAR heteróloga e uma

acetiltransferase, e tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), e pode ser usada para se obter (Z)9-C14:OAc, isto é um acetato de acila graxo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14 abrigando uma dessaturação na conformação Z na posição 9. Este acetato de acila graxo é um componente importante de feromônios derivados de várias espécies, por exemplo a lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda*. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00250] Em outras modalidades, a célula de levedura expressa uma $\Delta 11$ dessaturase heteróloga, uma FAR heteróloga e uma acetiltransferase, e tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), e pode ser usada para produzir (Z)11-C14:OAc, isto é um acetato de acila graxo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14 abrigando uma dessaturação na conformação Z na posição 9. Este acetato de acila graxo é um componente importante de feromônios derivados de várias espécies, por exemplo o furador do milho europeu *Ostrinia nubilalis* e o enrolador de folha de faixa vermelha *Argyrotaenia velutinana*. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos

60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00251] Em uma outra modalidade, a célula de levedura expressa uma Δ 11 dessaturase heteróloga, uma FAR heteróloga, e tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), e pode ser usada para se obter (Z)11-C16:OH. Este álcool graxo pode ser oxidado em (Z)11-C16:Ald, que é um componente importante de feromônios derivados de várias espécies, por exemplo das lagartas da cápsula do algodão *Helicoverpa armigera*. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00252] Em outras modalidades, a célula de levedura expressa uma Δ 11 dessaturase heteróloga, uma FAR heteróloga e uma acetiltransferase, e tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), e pode ser usada para produzir (E)11-C14:OAc, isto é um acetato de acila graxo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14 abrigando uma dessaturação na conformação E na posição 9. Este acetato de acila graxo é um componente importante dos feromônios derivados de várias espécies, por exemplo a traça da maçã marrom claro *Epiphyas postvittana*. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou

perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00253] Em outras modalidades, a célula de levedura expressa uma $\Delta 10$ dessaturase heteróloga, uma FAR heteróloga e uma acetiltransferase, e tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), e pode ser usada para produzir (Z)10-C14:OAc, isto é um acetato de acila graxo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14 abrigando uma dessaturação na conformação Z na posição 10. Este composto pode ser encurtado para se obter (Z)8-C12:OAc, que é um componente importante de feromônios derivados de várias espécies, por exemplo a tração da fruta oriental *Grapholita molesta*. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00254] Os acetatos graxos dessaturados produzidos pela presente célula de levedura também podem ser dessaturados em mais do que uma posição. Os acetatos graxos dessaturados podem ser dessaturados em pelo menos duas posições, tal como pelo menos três posições, tal como quatro posições.

[00255] Por exemplo, os acetatos graxos (E)7, (Z)9 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22. Os acetatos graxos (E)3, (Z)8, (Z)11 dessaturada podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia

carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22. Os acetatos graxos (Z)9, (E)11, (E)13 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[00256] Os acetatos graxos dessaturados assim produzidos podem ser modificados ainda como é conhecido na técnica, por exemplo pelo encurtamento da cadeia carbônica. Assim, acetatos graxos (E)7, (Z)9 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12 partindo de acetatos graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, acetatos graxos (E)3, (Z)8, (Z)11 dessaturados podem ser produzido tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12 partindo de acetatos graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, e acetatos graxos (Z)9, (E)11, (E)13 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12 partindo de acetatos graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14.

[00257] Em algumas modalidades, a célula de levedura expressa uma $\Delta 9$ dessaturase heteróloga, uma $\Delta 11$ dessaturase, uma FAR heteróloga e uma acetiltransferase, e tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), e pode ser usada para produzir (E)9, (Z)11-C14:OAc, isto é um acetato de acila graxo tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14 abrigo uma dessaturação na conformação E na posição 9 e uma dessaturação na conformação Z na posição 11. Este composto pode ser encurtado para se obter (E)7, (Z)9:OAc, que é um componente importante dos feromônios derivados de várias espécies, por exemplo a traça da videira *Lobesia botrana*. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma

proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

Produção de um aldeído graxo dessaturado

[00258] Embora a presente divulgação proveja métodos para produzir álcoois graxos dessaturados e acetatos de acila graxos dessaturados, pode ser de interesse converter ainda os ditos álcoois graxos para os aldeídos correspondentes. Assim em algumas modalidades, o método pode compreender ainda a etapa de converter pelo menos parte dos álcoois graxos para aldeídos graxos, produzindo deste modo aldeídos graxos. Isto pode ser obtido pelos métodos químicos ou engenheirando-se ainda a célula de levedura.

[00259] Em algumas modalidades, a etapa de converter pelo menos parte dos álcoois graxos para os aldeídos correspondentes é uma etapa de conversão química. A conversão química está fundamentada na oxidação de álcoois graxos para os aldeídos correspondentes. Os métodos para realizar esta conversão são conhecidos na técnica. Os métodos preferidos são ecológicos e minimizam a quantidade de resíduo nocivo. Em algumas modalidades, o método compreende uma reação de oxidação de álcool aeróbica catalisada por Cobre(I)/ABNO (Steves & Stahl, 2013).

[00260] Assim em algumas modalidades, a conversão química pode ser livre de metal, evitando reagentes com base em metal pesado tóxico tais como óxidos de manganês, óxidos de cromo (Jones *ox.* PDC, PCC) ou compostos de rutênio (TPAP, Ley-Griffith *ox.*). Em algumas modalidades, a conversão não envolve reações com sulfóxido de dimetila ativado tais como a oxidação de Swern ou o tipo Pfitzner-Moffat. Tais reações podem envolver a formação estereotípica de traços de compostos de enxofre orgânicos que cheiram intensivamente tais como sulfeto de dimetila que podem ser difíceis de remover do produto alvo.

[00261] Em algumas modalidades, o método compreende uma reação

de Dess-Martin (Yadav *et al.*, 2004, Meyer *et al.*, 1994).

[00262] Em outras modalidades, a conversão química compreende a oxidação com hipoclorito de sódio sob condições de duas fases aquosa/orgânica (Okada *et al.*, 2014; Tamura *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009).

[00263] Em algumas modalidades, a oxidação química pode ser realizada com 1-clorobenzotriazol em um meio de cloreto de metileno contendo 25% de piridina (Ferrell e Yao, 1972).

[00264] Alternativamente, a oxidação de um álcool graxo ao aldeído graxo correspondente pode ser realizada enzimaticamente pelas álcool desidrogenases. A pessoa versada saberá como realizar a oxidação enzimática. Por exemplo, a oxidação enzimática pode ser realizada contatando-se as enzimas purificadas, extratos celulares ou células inteiras, com o álcool graxo.

[00265] Os álcoois graxos obteníveis pelas células e métodos aqui descritos podem ser convertidos ainda em aldeídos graxos pela introdução de um gene codificando uma acil-CoA graxa redutase EC 1.2.1.50 (FAR”) que forma aldeído. Deste modo, pelo menos parte da acil-CoA graxa dessaturada pode ser convertida para o aldeído graxo correspondente por uma acil-CoA graxa redutase (FAR”) que forma aldeído. As enzimas capazes de catalisar esta conversão podem catalisar uma reação de redução, onde a acil-CoA graxa é reduzida para um aldeído graxo. Tais enzimas são acil-CoA graxa redutases que forma aldeído, aqui também aludidas como FAR” ou “FAR” que forma aldeído”, com um número EC 1.2.1.50. Elas catalisam a seguinte reação:

[00266] $\text{Acil-CoA graxa} + \text{NADPH} = \text{aldeído graxo} + \text{NADP}^+ + \text{coenzima A.}$

[00267] Em algumas modalidades, a expressão da FAR” que forma aldeído pode ser induzida, por exemplo se os genes codificando esta enzima está sob o controle de promotores indutíveis, como é conhecido na técnica. A célula de levedura é incubada sob condições adequadas, tais como em um

meio apropriado e em uma temperatura apropriada como é conhecido por uma pessoa versada na técnica. Os meios adequados que sustentam o crescimento da levedura são conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados a: meio indefinido, completo tal como YEPD (ou YPD, Extrato de Levedura Peptona Dextrose), meio definido, completo tal como SC (Completo sintético), ou meio definido, de desprendimento tal como SD (Dextrose Sintética) faltando um ou mais elementos tais como um aminoácido ou um indutor.

[00268] Assim, os seguintes aldeídos graxos dessaturados podem ser obtidos:

(*Z*)- Δ^3 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ^3 álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ^5 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ^5 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ^6 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ^6 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ^7 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 7 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 8 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 8 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 9 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 9 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 10 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 10 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 11 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 11 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 12 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*E*)- Δ 12 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22;

(*Z*)- Δ 13 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22; e

(*E*)- Δ 13 aldeídos graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[00269] Em uma modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 8. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila

graxa tem um comprimento de cadeia de 9. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 10. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 11. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 12. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 13. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 14. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 15. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 16. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 17. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 18. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 19. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 20. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 21. Em uma outra modalidade, o aldeído de acila graxa tem um comprimento de cadeia de 22.

[00270] Os aldeídos graxos dessaturados produzidos pela presente célula de levedura também podem ser dessaturados em mais do que uma posição. Os aldeídos graxos dessaturados podem ser dessaturados em pelo menos duas posições, tal como pelo menos três posições, tal como quatro posições.

[00271] Por exemplo, aldeídos graxos (*E*)7, (*Z*)9 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, tal como 14. aldeídos graxos (*E*)3, (*Z*)8, (*Z*)11 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14. Os aldeídos graxos (*Z*)9, (*E*)11, (*E*)13 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, tal como 14.

[00272] Os aldeídos graxos dessaturados assim produzidos podem ser modificados ainda como é conhecido na técnica, por exemplo pelo encurtamento da cadeia carbônica. Assim, os aldeídos graxos (*E*)7, (*Z*)9 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12 partindo de aldeídos graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, os aldeídos graxos (*E*)3, (*Z*)8, (*Z*)11 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12 partindo de aldeídos graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14, e os aldeídos graxos (*Z*)9, (*E*)11, (*E*)13 dessaturados podem ser produzidos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 12 partindo de aldeídos graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 14.

Acil-CoA graxa

[00273] De modo que a célula de levedura produza álcoois graxos dessaturados e acetatos de acila graxos dessaturados como aqui descrito, a célula de levedura precisa das acil-CoA graxas como um substrato. Preferivelmente, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22. Em uma modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 8. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 9. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 10. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 11. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 12. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 13. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 14. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 15. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 16. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de

cadeia carbônica de 17. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 18. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 19. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 20. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 21. Em uma outra modalidade, a acil-CoA graxa tem um comprimento de cadeia carbônica de 22. Em algumas modalidades uma mistura de acil-CoA graxas tendo comprimentos de cadeia carbônica diferentes é provida.

[00274] Tais acil-CoA graxas podem ser providas no meio em que a célula de levedura é incubada, ou a célula de levedura pode ser naturalmente capaz de produzir tal acil-CoA graxa, ou a célula de levedura pode ser engenheirada de modo a produzir ou a aumentar a produção de tais acil-CoA graxas.

[00275] Em algumas modalidades, a célula de levedura não é naturalmente capaz de produzir uma acil-CoA graxa tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, ou uma mistura das mesmas. A célula de levedura pode neste caso ser engenheirada como é conhecido na técnica, por exemplo pela introdução de uma tioesterase heteróloga. Assim em algumas modalidades, um ácido nucleico codificando uma tioesterase é introduzido na célula de levedura, em um vetor ou pela integração genômica. O gene da tioesterase pode estar sob o controle de um promotor indutível, ou sob o controle de um promotor constitutivo. O ácido nucleico codificando uma tioesterase pode ser otimizado no códon para qualquer propósito para a célula de levedura, como é conhecido na técnica. Em particular, o ácido nucleico pode ser otimizado no códon para qualquer propósito para uma célula de *Yarrowia*, tal como uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

[00276] Em algumas modalidades, a tioesterase é derivada de um

organismo selecionado de *Cuphea palustris*, *Cuphea hookeriana*, *Cinnamomum camphora*, ou de *Escherichia coli*.

Célula de levedura

[00277] A presente divulgação provê uma célula de levedura que foi modificada para produzir um álcool graxo dessaturado, e opcionalmente um acetato de acila graxo dessaturado. Álcoois graxos dessaturados e acetatos de acila graxos dessaturados são componentes de feromônios, em particular de feromônios de traça. A célula de levedura aqui divulgada provê assim uma plataforma para a produção de feromônio de traça ecológico.

[00278] Em algumas modalidades, a célula foi modificada ao nível genômico, por exemplo pela edição de gene no genoma. A célula também pode ser modificada pela inserção de pelo menos uma construção de ácido nucleico tal como pelo menos um vetor. O vetor pode ser designado como é conhecido para a pessoa versada para permitir a integração de sequências de ácido nucleico no genoma, ou para permitir a expressão de um polipeptídeo codificado por uma sequência de ácido nucleico compreendida no vetor sem integração genômica.

[00279] Em certas modalidades da divulgação, a levedura ou fungos de gêneros incluindo, mas não limitados a, *Blakeslea*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cunninghamella*, *Lipomyces*, *Mortierella*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Pythium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, e *Yarrowia* são utilizados. Em certas modalidades particulares, organismos das espécies que incluem, mas não são limitados a, *Blakeslea trispora*, *Candida pulcherrima*, *C. revkaufi*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus curvatus*, *Cunninghamella echinulata*, *C. elegans*, *C. japonica*, *Lipomyces starkeyi*, *L. lipoferus*, *Mortierella alpina*, *M. isabellina*, *M. ramanniana*, *M. vinacea*, *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleanus*, *Pythium irregulare*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *R. gracilis*, *R. graminis*, *R. mucilaginosa*, *R. pinicola*, *Trichosporon pullans*, *T. cutaneum*, e *Yarrowia lipolytica* são usados. Em uma modalidade preferida, a

célula de levedura oleaginosa é uma célula *Yarrowia lipolytica*.

[00280] A célula de levedura a ser modificada, que também será aludida como a célula hospedeira, pode expressar enzimas nativas que são da mesma classe do que as enzimas que são necessárias para a produção de álcoois graxos dessaturados e acetatos de acila graxos dessaturados. Em alguns casos, entretanto, tais enzimas nativas podem ter um impacto negativo sobre o título de álcoois graxos dessaturados e/ou acetatos de acila graxos dessaturados que podem ser obtidos; as enzimas nativas podem assim ser inativadas pelos métodos conhecidos na técnica, tais como edição de gene. Por exemplo, os genes codificando as enzimas nativas tendo um impacto negativo sobre o título podem ser deletados ou mutados de modo a levar à perda total ou parcial de atividade da enzima nativa.

[00281] A célula de levedura da presente divulgação expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 como aqui descrito, pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado como aqui descrito, e opcionalmente uma acetiltransferase capaz de converter pelo menos parte do dito álcool graxo dessaturado para um acetato de acila graxo dessaturado, e tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10). Em algumas modalidades, a célula de levedura também expressa uma acetiltransferase. Em algumas modalidades, a célula de levedura também expressa uma tioesterase. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda

total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00282] Em uma modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa, e é deste modo capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa para um acil-CoA graxa dessaturada; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado, produzindo deste modo o dito álcool graxo dessaturado, e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de

homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00283] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00284] Em uma modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 3$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00285] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00286] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em

outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00287] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 5$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00288] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00289] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00290] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00291] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 6$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00292] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00293] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00294] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma

proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00295] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 7$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00296] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00297] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00298] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00299] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 8$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00300] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00301] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00302] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00303] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 9$ dessaturase heteróloga capaz

de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00304] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00305] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00306] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00307] Em uma modalidade particular, a $\Delta 9$ dessaturase tem pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18.

[00308] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem

atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00309] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 10$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00310] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00311] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00312] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e

pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00313] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 11$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00314] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00315] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00316] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00317] Em um modalidade particular, a dessaturase tem pelo menos

60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2. Em uma outra modalidade particular, a dessaturase tem pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura rosaceana* como apresentada na SEQ ID NO: 19. Em uma outra modalidade particular, a dessaturase tem pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura parallela* como apresentada na SEQ ID NO: 20.

[00318] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00319] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 12$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00320] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00321] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de

homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00322] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00323] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 13$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00324] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00325] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia

com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00326] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00327] Em uma outra modalidade, a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma $\Delta 14$ dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00328] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00329] Em algumas modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12. Em outras modalidades, a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de

Bicyclus anynana como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00330] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

Ácido nucleicos

[00331] Será entendido que por toda a presente divulgação, o termo “ácido nucleico codificando uma atividade” deve referir-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de codificar um peptídeo, uma proteína ou um fragmento dos mesmos tendo a dita atividade. Tais moléculas de ácido nucleico podem ser matrizes de leitura aberta ou genes ou fragmentos dos mesmos. A construção de ácido nucleico também pode ser um grupo de moléculas de ácido nucleico, que juntas podem codificar diversos peptídeos, proteínas ou fragmentos dos mesmos tendo uma atividade de interesse. O termo “atividade de interesse” refere-se a uma das seguintes atividades: uma atividade de dessaturase como aqui descrita, uma de acil-CoA graxa redutase, uma de acil-CoA graxa redutase que forma aldeído, uma de tioesterase e/ou uma de acetiltransferase. A natureza da uma ou mais atividades de interesse dependerão da natureza do produto desejado que se deseja obter com os presentes métodos.

[00332] Em algumas modalidades dos presentes métodos, cada um dos ácidos nucleicos codificando cada uma das presentes atividades, isto é uma dessaturase como aqui descrita, uma acil-CoA graxa redutase, uma acila graxa coA redutase que forma aldeído, uma tioesterase e/ou uma acetiltransferase, pode estar compreendida dentro do genoma da célula de levedura ou dentro de um vetor compreendido dentro da célula de levedura.

[00333] Em algumas modalidades, cada um dos ácidos nucleicos codificando cada uma das presentes atividades pode estar presente no genoma da dita célula de levedura, porque o ácido nucleico codifica uma proteína

nativa, ou porque a mesma foi integrada nela pelo engendramento de genoma ou edição de genoma ou cruzando-se células de levedura de tipos diferentes de combinação. Os métodos para integrar um ácido nucleico são bem conhecidos na técnica. Assim em algumas modalidades a atividade de interesse é codificada pela introdução de um ácido nucleico heterólogo na célula de levedura. O ácido nucleico heterólogo codificando a dita atividade pode ser otimizado no códon para qualquer propósito, ou pode compreender traços que podem ajudar a melhorar a atividade. Por exemplo, o ácido nucleico heterólogo pode ser modificado de modo a codificar uma proteína modificada. Tais modificações incluem, mas não são limitadas à introdução de sinais de localização, mutações de ganho de função ou perda de função, fusão da proteína a um marcador ou um rótulo tal como rótulo fluorescente, inserção de um promotor indutível, introdução de modificações que conferem estabilidade e/ou meia-vida aumentadas.

[00334] A introdução do ácido nucleico heterólogo codificando a atividade de interesse pode ser realizada pelos métodos conhecidos na técnica. A pessoa versada reconhecerá que tais métodos incluem, mas não são limitados a: métodos com base na clonagem e recombinação homóloga. Os métodos de clonagem pode envolver o planejamento e construção de um plasmídeo em um organismo tal como *Escherichia coli*. O plasmídeo pode ser um vetor integrativo ou um não integrativo. Os métodos livres de clonagem compreendem métodos com base na recombinação homóloga tais como PCR mediada por adaptâmero ou de reparo de intervalo. Tais métodos frequentemente resultam na integração do ácido nucleico heterólogo no genoma da célula de levedura.

[00335] Os ácidos nucleicos codificando as atividades de interesse podem estar presentes em alto número de cópia.

Métodos para a produção de um álcool graxo, um acetato de acila graxo ou um aldeído graxo

[00336] As células de levedura da presente divulgação podem ser usadas para a produção de um álcool graxo dessaturado e opcionalmente derivados dos mesmos, tais como um acetato de acila graxo dessaturado e/ou um aldeído graxo dessaturado. Conseqüentemente, também é aqui provido um método de produção de um álcool graxo em uma célula de levedura oleaginosa, o dito método compreendendo as etapas de prover uma célula de levedura e incubar a dita célula de levedura em um meio, em que a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa, convertendo deste modo pelo menos parte da dita acil-CoA graxa para um acil-CoA graxa dessaturada; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado, produzindo deste modo o dito álcool graxo dessaturado; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou tendo atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo

menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00337] Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00338] Em algumas modalidades, a célula de levedura é capaz de produzir álcoois graxos com um título total de pelo menos 1 mg/L, tal como pelo menos 5 mg/L, tal como pelo menos 10 mg/L, tal como pelo menos 25 mg/L, tal como pelo menos 50 mg/L, tal como pelo menos 100 mg/L, tal como pelo menos 250 mg/L, tal como pelo menos 500 mg/L, tal como pelo menos 1 g/L, tal como pelo menos 2 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 4 g/L, tal como pelo menos 5 g/L, tal como pelo menos 6 g/L, tal como pelo menos 7 g/L, tal como pelo menos 8 g/L, tal como pelo menos 9 g/L, tal como pelo menos 10 g/L, em que o título total é a soma do título de álcoois graxos dessaturados e o título de álcoois graxos saturados.

[00339] Em algumas modalidades, a célula de levedura é capaz de produzir álcoois graxos dessaturados com um título de pelo menos 1 mg/L, tal como pelo menos 5 mg/L, tal como pelo menos 10 mg/L, tal como pelo menos 25 mg/L, tal como pelo menos 50 mg/L, tal como pelo menos 100 mg/L, tal como pelo menos 250 mg/L, tal como pelo menos 500 mg/L, tal como pelo menos 1 g/L, tal como pelo menos 2 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 4 g/L, tal como pelo menos 5 g/L, tal como pelo

menos 6 g/L, tal como pelo menos 7 g/L, tal como pelo menos 8 g/L, tal como pelo menos 9 g/L, tal como pelo menos 10 g/L.

[00340] Em uma modalidade, os presentes métodos permitem a produção de álcoois graxos, em que os álcoois graxos dessaturados produzidos pela célula representam pelo menos 20% dos álcoois graxos totais produzidos pela célula, tal como pelo menos 30%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 50%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 70%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 90% dos álcoois graxos totais produzidos pela célula.

[00341] Em um modalidade particular, a célula é capaz de produzir (Z)11-C16:OH com um título de pelo menos 0,5 mg/L, tal como pelo menos 1 mg/L, tal como pelo menos 5 mg/L, tal como pelo menos 10 mg/L, tal como pelo menos 25 mg/L, tal como pelo menos 50 mg/L, tal como pelo menos 100 mg/L, tal como pelo menos 250 mg/L, tal como pelo menos 500 mg/L, tal como pelo menos 1 g/L, tal como pelo menos 2 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 4 g/L, tal como pelo menos 5 g/L, tal como pelo menos 6 g/L, tal como pelo menos 7 g/L, tal como pelo menos 8 g/L, tal como pelo menos 9 g/L, tal como pelo menos 10 g/L de (Z)11-C16:OH.

[00342] Em uma outra modalidade, o (Z)11-C16:OH produzido pela célula representa pelo menos 20% dos álcoois graxos totais produzidos pela célula, tal como pelo menos 30%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 50%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 70%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 90% dos álcoois graxos totais produzidos pela célula.

[00343] Já em outra modalidade, o (Z)11-C16:OH produzido pela célula representa pelo menos 20% dos álcoois graxos totais dessaturados produzido pela célula, tal como pelo menos 30%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 50%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 70%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 90% dos álcoois graxos

totais dessaturados produzido pela célula.

[00344] Em modalidades preferidas, o álcool graxo é um álcool graxo que é naturalmente encontrado nos feromônios produzidos pelas espécies da ordem *Lepidoptera*.

[00345] A célula de levedura pode ser como aqui descrita. Em algumas modalidades, a célula de levedura é uma célula de *Yarrowia*, tal como uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

Recuperação

[00346] Pode ser desejável recuperar os produtos obtidos pelos métodos aqui divulgados. Assim os presentes métodos podem compreender uma etapa adicional de recuperar o álcool graxo dessaturado e/ou o acetato de acila graxo dessaturado e/ou aldeído graxo dessaturado produzidos pelas presentes células de levedura.

[00347] Em algumas modalidades, o método compreende uma etapa de recuperar os álcoois graxos dessaturados. Em uma modalidade particular, o método compreende uma etapa de recuperar os álcoois graxos dessaturados tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22. Em outras modalidades, o método compreende uma etapa de recuperar os acetatos de acila graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22. Em uma modalidade particular, o método compreende uma etapa de recuperar os acetatos de acila graxos tendo um comprimento de cadeia carbônica de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22.

[00348] Os métodos para recuperar os produtos obtidos pela presente invenção são conhecidos na técnica e podem compreender uma extração com um solvente hidrofóbico tal como decano, hexano ou um óleo vegetal.

[00349] Os produtos recuperados podem ser modificados ainda mais, por exemplo os álcoois graxos dessaturados podem ser convertidos para os aldeídos graxos dessaturados correspondentes como aqui descrito acima.

[00350] Os produtos recuperados, isto é os álcoois graxos dessaturados e/ou acetatos de acila graxos dessaturados, também podem ser formulados dentro de uma composição de feromônio. A composição pode compreender ainda um ou mais compostos adicionais tais como um carreador ou substrato líquidos ou sólidos. Os aldeídos graxos obtidos a partir dos ditos álcoois graxos dessaturados também podem estar compreendidos em tais composições.

Kit

[00351] É aqui provido um kit de partes para realizar os presentes métodos. O kit de partes pode compreender uma célula de levedura oleaginosa “pronta para o uso” como aqui descrito. Em uma modalidade, a célula de levedura é uma célula de *Yarrowia*, tal como uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

[00352] Em uma outra modalidade, o kit de partes compreende uma construção de ácido nucleico codificando as atividades de interesse a serem introduzidas na célula de levedura. O kit de partes pode compreender uma construção de ácido nucleico para reduzir a atividade de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10). A construção de ácido nucleico pode ser provida como uma pluralidade de construções de ácido nucleico, tais como uma pluralidade de vetores, em que cada vetor codifica um ou várias das atividades desejada, ou em que cada vetor permite a redução da atividade de uma ou mais de Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT. Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4,

Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00353] O kit de partes pode opcionalmente compreender a célula de levedura a ser modificada. Em algumas modalidades, a célula de levedura a ser modificada já tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10). Em modalidades específicas, a célula de levedura tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos Pex10 ou uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8 e pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Fao1 ou GPAT), como descrito acima.

[00354] Em algumas modalidades, o kit de partes compreende todos do acima.

Composição de feromônio

[00355] A presente divulgação provê assim compostos, em particular álcoois graxos dessaturados e acetatos de acila graxos, assim como derivados dos mesmos, e seu uso. Em particular, os compostos obteníveis usando as presentes células e métodos são úteis como componentes de composições de feromônio. Tais composições de feromônio podem ser úteis para o controle de praga integrado. Eles podem ser usados como é conhecido na técnica para por exemplo romper o combinação.

[00356] Os álcoois graxos dessaturados e acetatos de acila graxos dessaturados obteníveis pelos presentes métodos ou usando as presentes células de levedura podem ser formulados em uma composição de feromônio.

[00357] Tais composições de feromônio podem ser usadas como produtos de controle de praga integrados, que podem ser usados em um método de monitorar a presença de praga ou em um método de romper o combinação da praga.

[00358] As composições de feromônio como aqui divulgadas podem ser usadas como biopesticidas. Tais composições podem ser pulverizadas ou dispensadas em uma cultura, em um campo ou em um pomar. Elas também podem, como é conhecido na técnica, ser embebidas por exemplo em um septo de borracha, ou misturadas com outros componentes. Isto pode resultar no rompimento do combinação, prevenindo deste modo a reprodução de praga, ou a mesma pode ser usada em combinação com um dispositivo de aprisionamento para aprisionar as pragas. Os exemplos não limitantes de pragas contra as quais as presentes composições de feromônio podem ser usadas são: lagartas da cápsula do algodão (*Helicoverpa armigera*), furador da haste listrada (*Chilo suppressalis*), traça do dorso de diamante (*Plutella xilostella*), traça do repolho (*Mamestra brassicae*), lagarta do coração do repolho grande (*Crociodolomia binotalis*), furador da haste do milho europeu (*Sesamia nonagrioides*), asas claras da groselha (*Synanthedon tipuliformis*) e traça emplumada da alcachofra (*Platyptilia carduidactilal*). Conseqüentemente, o uso das presentes composições em uma cultura pode levar ao rendimento de safra aumentada, substancialmente sem nenhum impacto ambiental.

[00359] As quantidades relativas de álcoois graxos e acetatos de acila graxos nas presentes composições de feromônio podem variar dependendo da natureza da safra e/ou da praga a ser controlada; variações geográficas também podem existir. A determinação das quantidades relativas opcionais podem assim requerer otimização de rotina. As composições de feromônio também podem compreender aldeídos graxos.

[00360] Os exemplos de composições usadas como repelentes podem ser encontrados em Kehat & Dunkelblum, 1993, para *H. armigera*, em Alfaro *et al.*, 2009, para *C. suppressalis*, em Eizaguirre *et al.*, 2002, para *S. nonagrioides*; em Wu *et al.*, 2012, para *P. xilostella*; em Bari *et al.*, 2003, para *P. carduidactila*.

[00361] Em algumas modalidades, a composição de feromônio pode compreender ainda um ou mais compostos adicionais tais como um líquido ou carreador ou substrato sólido. Por exemplo, os carreadores ou substratos adequados incluem óleos vegetais, óleos minerais refinados ou frações dos mesmos, borracha, plásticos, sílica, terra diatomácea, matriz serosa e pó de celulose.

[00362] A composição de feromônio pode ser formulada como é conhecido na técnica. Por exemplo, a mesma pode estar na forma de uma solução, um gel, um pó. A composição de feromônio pode ser formulada de modo que a mesma possa ser facilmente dispensada, como é conhecido na técnica.

Exemplos

Exemplo 1: Construção de plasmídeos

[00363] Todos os BioBricks foram amplificados pela PCR para se obter os fragmentos de DNA para clonar em vetores e para nocautes de gene. Os iniciadores estão listados na Tabela 1 e os fragmentos de DNA resultantes estão listados na Tabela 2. Os produtos de PCR foram separados em um gel de agarose a 1% contendo Safe-Red® (iNtRON Biotechnology). Os produtos de PCR do tamanho correto foram excisados do gel e purificados usando os kits Nucleospin® Gel e PCR Clean-supra (Macherey-Nagel).

Tabela 1: Iniciadores.

| Nome do iniciador | Sequência do iniciador, 5'→3' | SEQ ID NO: |
|--|---|------------|
| PR-141 | agaacagcUgaagcttcgtacg | 25 |
| PR-142 | AGGCCACUAGTGGATCTGATATCAC | 26 |
| PR-10851 (Atrd11 cassette de expressão_fw) | deagtgcaggUgacgcagtaggatgtcctgc | 27 |
| PR-10853 (Hs_Far cassette de expressão_fw) | deacctgcacUagagaccgggttg | 28 |
| PR-10655 (EpiVecIL_fw) | accattgcUgtagatatgtcttgtgtgaagg | 29 |
| PR-10656 (EpiVecIL_rev) | atcatgtaaUtattatgtcacgcttacattc | 30 |
| PR-10702 (Δ Pex10IL_up_fw) | cattgtaactagtctctggaggg | 31 |
| PR-10703 (Δ Pex10IL_up_rev) | acgaagttaUtttgagccgaggcagattg | 32 |
| PR-10704 (Δ Pex10IL_down_fw) | acgaagttaUtgacgaggtctggatggaag | 33 |
| PR-10705 (Δ Pex10IL_down_rev) | cattgctaagaatccaaactggag | 34 |
| PR-10767 (NatMxSynIL-start_rev_new) | tcattgacatggcatagac | 35 |
| PR-11047 (NatMxSynIL-end_rev_new) | aataacttcgUatagcatacattatacgaagtattcgagcgtcccaaac | 36 |

| | | |
|--------------------------------------|---|-----|
| PR-11110 (E.coli backboneUSER_fw) | atcgcgtgcattcggcgccgcatttaaacc | 37 |
| PR-11111 (E.coli backboneUSER_rev) | tcgcacgcattcggcgccgcaaatTTAAATAAATG | 38 |
| PR-11138 (Hphsyn_fw) | agcaatgggUaaaagcctgaactcaccgc | 39 |
| PR-11139 (Hphsyn_rev) | attacatgaUtattcctttgccctcggacg | 40 |
| PR-11694 (GPAT_up_USER_fw) | CGTGCGAUgcatctaggagctccattcagc | 41 |
| PR-11695 (GPAT_down_USER_rev) | CACGCGAUggacgagcagaccagc | 42 |
| PR-13494 (Nat-Tcyc-loxP_fw) | agggtacUactttgatgatactgc | 43 |
| PR-13549 (loxP-PrTefIntron_fw) | ataactcgUataatgtatgctatacgaagttagagaccgggttgccg gccc | 44 |
| PR-14269 (UraIL_fw) | atgccctctacgaggcccg | 45 |
| PR-14270 (UraIL_rev) | ctagcagttgatcttctggtag | 46 |
| PR-15426 (Δ hfd1_up_fw) | CGTGCGAUataagaaaaaacag | 47 |
| PR-15427 (Δ hfd1_up_rev) | AGCTGTTCUactaacctactctc | 48 |
| PR-15428 (Δ hfd1_down_fw) | AGTGGCCUttttattggtggtg | 49 |
| PR-15429 (Δ hfd1_down_rev) | CACGCGAUgcatagtctttcatatc | 50 |
| PR-15438 (Δ hfd4_up_fw) | CGTGCGAUagtatcctactgactaaaattg | 51 |
| PR-15439 (Δ hfd4_up_rev) | AGCTGTTCUagcggacaagtgtcaatgt | 52 |
| PR-15440 (Δ hfd4_down_fw) | AGTGGCCUatgtattttatcagtagtatc | 53 |
| PR-15441 (Δ hfd4_down_rev) | CACGCGAUattgataatacatttcta | 54 |
| PR-16463 (Δ FaolIL_up_fw) | CGTGCGAUTGGGGGAGGATTGCGATGGG | 55 |
| PR-16464 (Δ FaolIL_up_rev) | AGCTGTTCUTGTCAAGTAATCAAGCTAATG C | 56 |
| PR-16465 (Δ FaolIL_down_fw) | AGTGGCCUGCAAGAGACGAGTTTAGAAATA G | 57 |
| PR-16466 (Δ FaolIL_down_rev) | CACGCGAUGTGTAGTTCCTTGTAGTGTG | 58 |
| PR-16696 (GPAT_up_rev) | agetgttcUTACCGCACTTCCGGAACATC | 59 |
| PR-16698 (GPAT_100bpPr_down_fw) | agtggccUCCGATACTTGTGGTGTGAC | 60 |
| PR-10714 | ttgcttgcgaacctaatcc | 71 |
| PR-10766 | ataactcgUataatgtatgctatacgaagtataaggagtttgccgccc g | 72 |
| PR-10767 | tcattggacatggcatagac | 73 |
| PR-11047 | aataactcgUatagcatacattatacgaagtatcgagcgtcccaaac c | 74 |
| PR-13338 | ACCTGCACUgttgatgtgtttaatte | 75 |
| PR-141 | agaacagcUgaagcttcgtacg | 76 |
| PR-14148 | acgtgcaacgctUacgcaactaacatgaatg | 77 |
| PR-14149 | TGACTTCAACATTATATCGCTCTGA | 78 |
| PR-14279 | cgtgccaUagagaccgggt | 101 |
| PR-16618 | AGCCTGCGGUTAGTACTGCAAAAAGTGCTG | 102 |
| PR-142 | AGGCCACUAGTGGATCTGATATCAC | 79 |
| PR-14395 | cgtgccaUttgatattggttaacaatg | 103 |
| PR-14396 | aagcgttgcaagcUaagcaactatcctctgctgcg | 104 |
| PR-14397 | agtggccUccgagcgtcgacaagcatac | 105 |
| PR-14398 | cacgccaUgttagaagcaattggagaag | 106 |
| PR-14565 | agtggccUGGGGCTGGCGTGTGAAGGAG | 80 |
| PR-14566 | acgccaUCAGACCTCTCACACGGCATC | 81 |
| PR-14567 | TAATACGACTCACTATAGGGC | 82 |
| PR-14568 | cacgccaUCCTTGAGACGTTACCAGAGC | 83 |
| PR-14589 | cgtgccaUGCGGAGGAGCAATAGACATACGAT TTGAC | 84 |
| PR-14590 | aagegttgcaagcUTCCCCTCCCCACGGTG | 85 |
| PR-14591 | agtggccUCACCGAGGGATAGGGAACAC | 86 |
| PR-14592 | acgccaUTTAACACTGGACCGTACTGC | 87 |
| PR-15430 | CGTGCGAUggttctatacagatgg | 88 |
| PR-15431 | AGCTGTTCUatgatattttactaacc | 89 |
| PR-15432 | AGTGGCCUgattggcgttggttcaaatg | 90 |
| PR-15433 | CACGCGAUttgctcattcaccagaaaag | 91 |

| | | |
|----------|---|-----|
| PR-15434 | CGTGCGAUatgtacaagtatttctattg | 92 |
| PR-15435 | AGCTGTTCUgaatgataaagagataacag | 93 |
| PR-15436 | AGTGGCCUtggtggcgaagtgtacacc | 94 |
| PR-15437 | CACGCGAUggacaacaggccgatagaac | 95 |
| PR-15521 | cgtgcgaUaaggagttggcgcccgtt | 107 |
| PR-15522 | atgacagaUtgctgtagatgtcttgt | 108 |
| PR-15930 | acctgcggtUagtactgcaaaaagtgtgg | 96 |
| PR-16592 | AGTGCAGGUGCCACAATGGTGCCCAACAAG GGTTC | 97 |
| PR-16593 | CGTGCGAUCTATCGCTTTCGTCCCCAC | 98 |
| PR-16594 | aaccgcaggUGGTCCTGACCTCTAAG | 99 |
| PR-16595 | CACGCGAUCTACTCGTAGGACTTCTTCTC | 100 |
| PR-18486 | AGTGCAGGUGCCACAATGAACGAGATC | 109 |
| PR-18487 | CGTGCGAUTTAGGGGCCAG | 110 |
| PR-18490 | ACCGCAGGCUCCTACTCTCGAA | 111 |
| PR-18489 | CACGCGAUTTATCGAGACTTGTCC | 112 |
| PR-18499 | ATCTGTCAUGCCACAATGGCTCCCA | 113 |
| PR-18500 | CACGCGAUTTAGTCGTCCTTGGGG | 114 |

Tabela 2: fragmentos de DNA obtidos pela PCR usando o padrão e iniciadores indicados.

| ID e nome do fragmento DNA | Descrição | Fw_iniciador | Rv_iniciador | DNA Padrão |
|----------------------------|---|--|--|---|
| BB1135 | Cadeia principal do vetor para propagação na <i>E.coli</i> | PR-11110 (cadeia principal da <i>E.coli</i> USER_fw) | PR-11111 (cadeia principal da <i>E. coli</i> USER_rev) | pCfB2196 (Stovicek <i>et al.</i> , 2015) |
| BB01005 | Gene de resistência à higromicina | PR-11138 (Hphsyn_fw) | PR-11139 (Hphsyn_rev) | Gene de resistência à higromicina |
| BB1131 | Cassete de expressão Hs_FAR | PR-10853 (cassete de expressão Hs_Far_fw) | PR-10655 (EpiVecIL_fw) | pCfB3465 |
| BB1132 | Parte do vetor pCfB3465 | PR-10656 (EpiVecIL_rev) | PR-10851 (cassete de expressão fw de Atrd11) | pCfB3465 |
| BB1144 | Região genômica montante de <i>Pex10</i> | PR-10702 (Δ Pex10IL_supra_fw) | PR-10703 (Δ Pex10IL_supra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1145 | Região genômica jusante de <i>Pex10</i> | PR-10704 (Δ Pex10IL_infra_fw) | PR-10705 (Δ Pex10IL_infra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1338 | Marcador de resistência à hidromicina | PR-141 | PR-142 | Marcador de resistência à hidromicina |
| BB1346 | Marcador de resistência à nourseotricina | PR-141 | PR-142 | Marcador de resistência à nourseotricina |
| BB1347 | Início do cassete de resistência à nourseotricina2/3 | PR-13549 (loxP-PrTefIntron_fw) | PR-10767 (NatMxSynIL-início_rev_novo) | BB1346 |
| BB1348 | final do cassete de resistência à nourseotricina2/3 | PR-13494 (NatTcyc-loxP_fw) | PR-11047 (NatMxSynIL-fim_rev_novo) | BB1346 |
| BB1349 | Região genômica montante de <i>Pex10</i> fundido ao início do cassete de resistência à nourseotricina 2/3 | PR-10702 (Δ Pex10IL_supra_fw) | PR-10767 (NatMxSynIL-início_rev_novo) | BB1144/BB1347 |

| | | | | |
|--------|---|--------------------------------------|--|---|
| BB1350 | Região genômica a jusante de <i>Pex10</i> fundido ao 2/3 final do cassete de resistência à nourseotricina | PR-13494 (Nat-Tcyc-loxP_fw) | PR-10705 (Δ Pex10IL_infra_rev) | BB1348/BB1145 |
| BB1427 | Cassete marcador Ura3 | PR-141 | PR-142 | Cassete marcador Ura3 |
| BB1543 | Região genômica a montante de <i>Hfd1</i> | PR-15426 (Δ hfd1_supra_fw) | PR-15427 (Δ hfd1_supra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1544 | Região genômica a jusante de <i>Hfd1</i> | PR-15428 (Δ hfd1_infra_fw) | PR-15429 (Δ hfd1_infra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1549 | Região genômica a montante de <i>Hfd4</i> | PR-15438 (Δ hfd4_supra_fw) | PR-15439 (Δ hfd4_supra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1550 | Região genômica a jusante de <i>Hfd4</i> | PR-15440 (Δ hfd4_infra_fw) | PR-15441 (Δ hfd4_infra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1725 | Região genômica a montante de <i>Fao1</i> | PR-16463 (Δ Fao1IL_supra_fw) | PR-16464 (Δ Fao1IL_supra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1726 | Região genômica a jusante de <i>Fao1</i> | PR-16465 (Δ Fao1IL_infra_fw) | PR-16466 (Δ Fao1IL_infra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1757 | Região genômica a montante de <i>Fao1</i> fundida ao início 2/3 do cassete Ura3 | PR-16463 (Δ Fao1IL_supra_fw) | PR-14270 (UraIL_rev) | BB1725/BB1427 |
| BB1758 | Região genômica a jusante de <i>Fao1</i> fundida ao final 2/3 do cassete Ura3 | PR-14269 (UraIL_fw) | PR-16466 (Δ Fao1IL_infra_rev), | BB1726/BB1427 |
| BB1782 | Região genômica a montante de <i>Pex10</i> | PR-11694 (GPAT_supra_USER_fw) | PR-16696 (GPAT_supra_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1784 | Região genômica a jusante de <i>Pex10</i> | PR-16698 (GPAT_100bpPr_infra_fw) | PR-11695 (GPAT_infra_USER_rev) | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1014 | NatSyn | PR-10766 | PR-10767 | pCfB3405 |
| BB1144 | Região genômica a montante de <i>Pex10</i> | PR-10702 | PR-10703 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1145 | Região genômica a jusante de <i>Pex10</i> | PR-10704 | PR-10705 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1351 | NatSyn | PR-10714 | PR-11047 | pCfB3405 |
| BB1352 | <i>Pex10</i> _supra-NatSyn | PR-10702 | PR-10767 | BB1144/BB1014 |
| BB1353 | NatSyn- <i>Pex10</i> _infra | PR-10714 | PR-10705 | BB1351/BB1145 |
| BB1360 | terminador <i>pex20</i> e <i>lip2</i> | PR-14148 | PR-14149 | Fig. 3 |
| BB1439 | Região genômica a montante da região intergênica IntE_1 | PR-14395 | PR-14397 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1440 | Região genômica a jusante da região intergênica IntE_1 | PR-14397 | PR-14398 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1471 | Região genômica a montante da região intergênica IntC_1 | PR-14565 | PR-14566 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |

| | | | | |
|--------|--|----------|----------|---|
| BB1472 | Região genômica adjacente da região intergênica IntC_1 | PR-14567 | PR-14568 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1483 | Região genômica adjacente da região intergênica IntE_4 | PR-14589 | PR-14590 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1484 | Região genômica adjacente da região intergênica IntE_4 | PR-14591 | PR-14592 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1558 | Promotor EXP | PR-15521 | PR-15522 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1687 | promotor fundido ao promotor Tefintron GPD | PR-13338 | PR-15930 | pCfB3465 |
| BB1739 | Δ 11 dessaturase A. <i>segetum</i> | PR-16592 | PR-16593 | SEQ ID NO: 67 |
| BB1740 | FAR <i>H. Armigera</i> | PR-16594 | PR-16595 | SEQ ID NO: 14 |
| BB1741 | Promotor Tefintron | PR-14279 | PR-16618 | DNA genômico de <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 |
| BB1963 | Cassete marcador de seleção de Leu2 | PR-141 | PR-142 | Fig. 2 |
| BB2601 | SliDes11 | PR-18499 | PR-18500 | SEQ ID NO: 65 |
| BB2602 | Dmd9 | PR-18490 | PR-18489 | SEQ ID NO: 63 |
| BB2603 | ScAft1 | PR-18486 | PR-18487 | SEQ ID NO: 62 |

[00364] O BioBrick BB1135 foi tratado com a endonuclease de corte Nb.BsmI (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante e purificado usando os kits Nucleospin® Gel e PCR Clean-supra (Macherey-Nagel) antes do uso. Os fragmentos de DNA foram montados pela clonagem USER por intermédio do seguinte protocolo: 1 a 1,3 µl de cada BioBrick (listado na Tabela 3), 0,5 µl de CutSmart® (New England BioLabs), e 0,5 µl da enzima USER (New England Biolabs) foram misturados e incubados a 37°C durante 25 min e a 25°C durante 25 min. A reação foi transformada nas células DHalpha da *E. coli* quimicamente competentes e as células foram plaqueadas sobre as placas de ágar com Caldo de Lisogenia (LB) com 100 mg/L de ampicilina. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C e as colônias resultantes foram triadas pela PCR de colônia. Os plasmídeos foram purificados a partir de culturas noturnas de *E. coli* e a clonagem correta foi confirmada pelo sequenciamento. Os vetores construídos estão listados na Tabela 3.

[00365] Os plasmídeos precursores pCfB4778, pCfB5219 e pCfB4781 foram digeridos como descrito em Jensen *et al.*, 2014 antes da montagem pela

clonagem USER. Os fragmentos de DNA foram montados pela clonagem USER por intermédio do seguinte protocolo: 1 a 1,3 µl de cada BioBrick (listados na Tabela 8), 0,5 µl de CutSmart® (New England BioLabs), e 0,5 µl de enzima USER (New England Biolabs) foram misturados e incubados a 37°C durante 25 min e a 25°C durante 25 min. A reação foi transformada nas células DHalfa da *E. coli* quimicamente competentes e as células foram plaqueadas sobre placas de ágar com Caldo de Lisogenia (LB) com 100 mg/L de ampicilina. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C e as colônias resultantes foram triadas pela PCR de colônia. Os plasmídeos foram purificados a partir de culturas noturnas de *E. coli* e a clonagem correta foi confirmada pelo sequenciamento. Os vetores construídos estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Vetores.

| Nome do vetor | Marcador de seleção | Fragmentos de DNA montados |
|---------------|---------------------|--|
| pCfB3465 | Ura3 | |
| pCfB5110 | NatSyn | BB1135, BB1346, BB1543, BB1544 |
| pCfB5113 | HphSyn | BB1135, BB1338, BB1549, BB1550 |
| pCfB3516 | HphSyn | BB01005, BB1131, BB1132 |
| pCfB5573 | HphSyn | BB1135, BB1338, BB1757, BB1758 |
| pCfB5750 | Ura3 | BB1135, BB1427, BB1782, BB1784 |
| pCfB4158 | Leu2 | |
| pCfB4781 | NatSyn | BB1135, BB1360, BB1346, BB1471, BB1472 |
| pCfB4778 | Ura3 | BB1135, BB1360, BB1439, BB1440, BB1427 |
| pCfB5219 | HphSyn | BB1135, BB1360, BB1338, BB1483, BB1484 |
| pCfB5574 | NatSyn | BB1135, BB1346, BB1725, BB1726 |
| pCfB5929 | HphSyn | pCfB5219, BB1687, BB1739, BB1740 |
| pCfB5930 | NatSyn | pCfB4781, BB1687, BB1739, BB1740 |
| pCfB6397 | Leu2 | BB1135, BB1963, BB1782, BB1784 |
| pCfB7235 | Ura3 | pCfB4778, BB2603, BB1687, BB1740 |
| pCfB7239 | HphSyn | pCfB5219, BB2602, BB1741 |
| pCfB7240 | HphSyn | pCfB5219, BB1558, BB2601 |
| pCfB7681 | HphSyn | BB1135, BB1338, BB1782, BB1784 |
| pCfB7681 | HphSyn | BB1135, BB1338, BB1782, BB1784 |
| pCfB7682 | Ura3 | BB1135, BB1427, BB1725, BB1726 |
| pCfB7725 | NatSyn | BB1135, BB1346, BB1782, BB1784 |
| pCfB7869 | NatSyn | BB1135, BB1346, BB1549, BB1550 |

Exemplo 2: Construção de cepas

[00366] As cepas construídas estão listadas nas Tabelas 4 e 5. Antes da transformação em *Y. lipolytica*, os plasmídeos de expressão foram linearizados com NotI. O plasmídeo linearizado ou BioBricks foram transformados em *Y. lipolytica* GB 20 (Angerer, 2014) usando um protocolo

com base em acetato de lítio (Chen, 1997). Depois da transformação as células foram recuperadas em 500 µl de meio YPD durante 2 horas a 30°C. Os transformantes positivos foram selecionados em meio completo sintético (SC) (Sigma-Aldrich) faltando uracila ou leucina ou em meio YPD contendo higromicina (50 mg/L) ou nourseotricina (250 mg/L). A integração das construções nocaute dentro do genoma de *Y. lipolytica* foi confirmada pela PCR de colônia.

[00367] Os cassetes marcadores Ura3, NatSyn, HphSyn, que foram flanqueados pelos sítios loxP, foram removidos da cepa ST5255 usando um sistema com base na Cre recombinase como a seguir. A cepa 5255 foi transformada com o vetor pCfB4158, expressando a Cre recombinase usando um protocolo com base em acetato de lítio (Chen, 1997). Depois da transformação, as células foram recuperadas em 500 µl de meio YPD durante 2 horas a 30°C e plaqueadas no meio SC sem leucina. As colônias foram triadas quanto à remoção bem sucedida do marcador pelo plaqueamento de réplica no meio SC sem uracila e YPD suplementado com higromicina ou nourseotricina. Nenhum crescimento de célula nestas placas indica remoção bem sucedida de marcador.

[00368] A cepa ST6527 expressa Atrd11 e HarFAR de uma região intergênica no cromossoma C. Os cassetes de expressão de gene são os mesmos como em pCfB5929. Adicionalmente, a matriz de leitura aberta dos genes *HFD4* (YALI0B01298g) e *HFD1* (YALI0F23793g), assim como nucleotídeos -1130 a -100 a montante da sequência de codificação de *GPAT* (YALI0C00209g) foram deletados. Um códon de parada e mudança de matriz prematuro foi introduzido nas matrizes de leitura aberta de *PEX10* (YALI0C01023g) e *FAO1* ((YALI0B14014g) que resulta nos genes não funcionais.

[00369] A cepa ST7394 expressa Dmd9, HarFAR e Atf1 como descrito em pCfB6969 e pCfB7600 das regiões intergênicas nos cromossomas C e D

(figura 4). Adicionalmente, a matriz de leitura aberta de genes *HFD4*, *HFD2*, *HFD3* e *HFD1*, assim como os nucleotídeos -1130 a -100 a montante da sequência codificadora de *GPAT* (YALI0C00209g) foram deletados. Um códon de parada e mudança de matriz prematuro foi introduzido na *Pex10* e *FAO1* que resulta em genes não funcionais.

Tabela 4: Cepas. Atrd11 = Δ 11 dessaturase de *Amyelois transitella*; HsFAR = acil-CoA graxa redutase de *Heliothis subflexa*

| Nome da cepa | Descrição da cepa | Cepa precursora | Plasmídeos/BioBricks |
|--------------|--|-----------------|----------------------|
| ST3683 | <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 | - | - |
| ST3737 | Δ <i>Pex10</i> | ST3683 | BB1352/BB1353 |
| ST3842 | Δ <i>Pex10</i> Atrd11 Hs_FAR | ST3737 | pCfB3516 |
| ST3844 | Atrd11 Hs_FAR | ST3683 | pCfB3465 |
| ST5107 | Atrd11 Hs_FAR Δ <i>hfd1</i> | ST3844 | pCfB5110 |
| ST5110 | Atrd11 Hs_FAR Δ <i>hfd4</i> | ST3844 | pCfB5113 |
| ST5255 | Atrd11 Hs_FAR Δ <i>hfd1</i> Δ <i>hfd4</i> | ST5107 | pCfB5113 |
| ST5791 | Atrd11 Hs_FAR Δ <i>hfd1</i> Δ <i>hfd4</i> Δ <i>Pex10</i> Δ <i>Fao1</i> GPAT_100bpPr | ST5789 | pCfB5750 |
| ST6277 | Atrd11 Hs_FAR Δ <i>hfd1</i> Δ <i>hfd4</i> Δ <i>Pex10</i> Δ <i>Fao1</i> GPAT_100bpPr | ST5789 | pCfB6397 |
| ST6289 | Atrd11 Hs_FAR Δ <i>hfd1</i> Δ <i>hfd4</i> Δ <i>Pex10</i> Δ <i>Fao1</i> GPAT_100bpPr Atrd11 HarFAR | ST6277 | pCfB5929 |
| ST6360 | Δ <i>hfd4</i> Δ <i>hfd1</i> Δ <i>Pex10</i> Δ <i>Fao1</i> Atrd11 Des11 HsFAR HarFAR Atf1 | ST5789 | pCfB7235 pCfB7240 |
| ST6379 | Atrd11 Hs_FAR Δ <i>hfd1</i> Δ <i>hfd4</i> Δ <i>Pex10</i> Δ <i>Fao1</i> GPAT_100bpPr Atrd11 HarFAR Atrd11 HarFAR | ST6289 | pCfB5930 |
| ST7458 | Atrd11 HsFAR 100bp_PrGPAT | ST3844 | pCfB7681 |
| ST7509 | Δ <i>Pex10</i> Atrd11 HsFAR Δ <i>Fao1</i> | ST3842 | pCfB7682 |
| ST7510 | Atrd11 HsFAR Δ <i>hfd1</i> 100bp_PrGPAT | ST5107 | pCfB7681 |
| ST7511 | Atrd11 HsFAR Δ <i>hfd4</i> 100bp_PrGPAT | ST5110 | pCfB7725 |
| ST7514 | Δ <i>Pex10</i> Atrd11 HsFAR 100bp_PrGPAT | ST3842 | pCfB5750 |
| ST7787 | Atrd11 HsFAR Δ <i>Fao1</i> | ST3844 | pCfB5573 |
| ST7929 | Atrd11 HsFAR Δ <i>Fao1</i> Δ <i>hfd4</i> | ST7787 | pCfB7869 |

Tabela 5: Cepas e produção de álcool graxo

| Nome da cepa | Descrição da cepa | Cepa precursora | Plasmídeos/BioBricks integrados | Z11-C16:OH [mg/L] | Álcoois graxos totais [mg/L] | Porcentagem de Z11-C16:OH álcoois graxos totais |
|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|------------------------------|---|
| <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 | Controle Negativo | N/A | N/A | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| ST3844 | Atrd11 Hs_FAR | <i>Yarrowia lipolytica</i> GB20 | pCfB3465 | 0,78 ± 0,07 | 1,25 ± 0,11 | 62 ± 2 |
| ST5107 | Atrd11 Hs_FAR Δ <i>hfd1</i> | ST3844 | pCfB5110 | 2,39 ± 0,5 | 3,93 ± 0,96 | 61 ± 5 |

| | | | | | | |
|--------|--|--------|-------------------|--------------|--------------|--------|
| ST5110 | Atrd11 Hs_FAR <i>Δhfd4</i> | ST3844 | pCfB5113 | 1,54 ± 0,70 | 2,31 ± 0,93 | 65 ± 6 |
| ST3842 | Atrd11 Hs_FAR <i>ΔPex10</i> | ST3737 | pCfB3516 | 1,38 ± 0,36 | 6,04 ± 2,62 | 24 ± 4 |
| ST5255 | Atrd11 Hs_FAR <i>Δhfd1 Δhfd4</i> | ST5107 | pCfB5113 | 3,46 ± 0,96 | 7,61 ± 2,13 | 45 ± 0 |
| ST5452 | Atrd11 Hs_FAR <i>Δhfd1 Δhfd4 ΔPex10</i> | ST5450 | BB1349/BB1 350 | 4,79 ± 0,47 | 11,40 ± 0,91 | 42 ± 4 |
| ST5789 | Atrd11 Hs_FAR <i>Δhfd1 Δhfd4 ΔPex10 ΔFao1</i> | ST5452 | pCfB5573 | 14,93 ± 3,60 | 64,46 ± 6,29 | 23 ± 4 |
| ST5791 | Atrd11 Hs_FAR <i>Δhfd1 Δhfd4 ΔPex10 ΔFao1 ΔPrGPAT</i> | ST5789 | pCfB5750 | 26,20 ± 8,85 | 57,37 ± 19,5 | 46 ± 1 |

Exemplo 3: Produção de álcoois graxos pela levedura

[00370] Um clone individual de cada cepa foi inoculado em 5 ml de meio YPD com 8% de glicose (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 80 g/L de dextrose) em tubos de vidro de 12 ml (Duran, Wertheim, Alemanha) com tampas metálicas labocap (Lüdiswiss, Flawil, Suíça) e incubados durante a noite a 30°C com agitação a 250 rpm. No dia seguinte a cultura noturna foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e os grânulos foram recolocados em suspensão em 2 ml de meio limitado em nitrogênio (2,9 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1,7 g/L de YNB (sem aminoácidos e sulfato de amônio), 240 mg/L de leucina, 76 mg/L de lisina, 20 mg/L de uracila e 60 g/L de glicose). As culturas foram incubadas durante 48 horas a 30°C e agitadas a 250 rpm.

[00371] Para a extração, 1 mL de cultura foi transferida para um frasco de vidro de 4 mL e 10 µL de estoque padrão interno (1 µg/µL de éster (Z)-10-heptan-1-il metílico em 100% de etanol) foram adicionados. Os frascos foram cobertos com pedaços pequenos de folha de alumínio e nós usamos uma agulha para perfurar furos pequenos nas tampas de folha de alumínio. As amostras foram turbilhoadas e colocadas a -80°C para armazenagem até a análise. As amostras foram secadas por congelamento em um sistema de secagem por congelamento (secadores de bandeja Freezone6 e Stoppening, Labconco, Kansas City, USA) a -40°C, depois 1 mL de clorofórmio:metanol

2:1 foi adicionado para romper as células. A mistura foi turbilhonada durante 45 s e deixadas na temperatura ambiente durante 4 horas. Os solventes orgânicos foram evaporados lentamente sob uma corrente de nitrogênio. 1 ml de hexano foi adicionado, as amostras foram turbilhonadas durante 10 s, centrifugadas e 200 µl foram transferidos para um novo frasco de vidro. As análises de GC-MS foram realizadas em um Hewlett Packard 6890 GC ligado a um detector seletivo de massa HP 5973. A GC foi equipada com uma coluna INNOWax (30 m×0,25 mm x 0,25 µm), e hélio foi usado como gás carreador (velocidade média: 33 cm/s). A MS foi operada no modo de impacto de elétron (70 eV), varrendo entre m/z 30 e 400, e o injetor foi configurado no modo sem divisão a 220°C. A temperatura da estufa foi ajustada para 80°C durante 1 min, depois aumentada em uma taxa de 10°C/min até 210°C, seguido por uma contensão a 210°C durante 15 min, e depois aumentada em uma razão de 10 C/min até 230°C seguido por uma contensão a 230°C durante 20 min. Os compostos foram identificados pela comparação de tempos de retenção e espectros de massa com aqueles de compostos de referência disponíveis na coleção do laboratório. Os compostos foram quantificados pela Corrente de Íon Total (TIC) registrada. Os dados foram analisados pelo software ChemStation e iWork Numbers da Agilent. As concentrações de álcoois graxos foram calculados com base no padrão interno (Tabela 4).

[00372] A deleção de genes potencialmente implicados na degradação de álcool graxo (*HFD1*, *HFD4*, *FAO1*, *PEX10*), melhorou a produção de álcoois graxos totais, mas diminuiu a razão de álcool dessaturado para os álcoois graxos totais. A diminuição da expressão do gene codificando a glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), que catalisa a primeira reação para a biossíntese de glicerolipídeos, aumentou a produção de álcool dessaturado, aumentando a razão de álcool dessaturado (Z11-16:OH) para os álcoois totais de 23 para 46%. Ao mesmo tempo, a concentração de lipídeos e ácidos graxos

livres (medidos como ésteres metílicos de ácido graxo total) diminuiu de 1,8 para 0,9 g/L.

[00373] As cepas da Tabela 4 foram inoculadas em 3 mL de meio mineral para uma densidade óptica (600 nm) de 1 em placas de 24 poços profundos (EnzyScreen, NL). A composição do meio mineral foi como em Jensen *et al*, 2014, mas a glicose foi substituída por 70 g/L de glicerol. O meio foi suplementado com 760 mg/L de lisina, 760 mg/L de leucina e 200 mg/L de uracila. As culturas foram incubadas durante 67 horas a 30°C agitadas a 250 rpm.

[00374] Para a extração do álcool graxo, 1 mL de cultura foi transferido para um frasco de vidro de 4 mL e 10 µL de solução de padrão interno (2 µg/µL de éster (Z)-10-heptan-1-il metílico em 100% de etanol) foram adicionados. Os frascos foram cobertos com pedaços pequenos de folha de alumínio e uma agulha foi usada para perfurar pequenos furos nas coberturas de folha de alumínio. As amostras foram turbilhonadas e colocadas a -80°C para armazenagem até análise. As amostras foram secadas por congelamento em um sistema de secagem por congelamento (bandejas secadoras Freezone6 e Stopping, Labconco, Kansas City, USA) a -40°C, depois 1 mL de clorofórmio:metanol 2:1 foi adicionado para romper as células. A mistura foi turbilhonada durante 45 s e deixada na temperatura ambiente durante 4 horas. Os solventes orgânicos foram evaporados lentamente sob uma corrente de nitrogênio. 1 ml de hexano foi adicionado, as amostras foram turbilhonadas durante 10 s, centrifugadas e 200 µl foram transferidos para um novo frasco de vidro. A quantificação foi realizada com um SCION TQ GC-MS (Bruker), equipado com uma coluna INNOWax 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, com hélio como o gás carreador. O injetor foi configurado no modo não dividido a 250°C, a temperatura da estufa foi ajustada para 80°C durante 1 min, depois aumentada a uma razão de 10°C/min até 210°C, seguida por uma contensão a 210°C durante 10 min, e

depois aumentada a uma razão de 10°C/min a 230°C seguida por uma contensão a 230°C durante 5 min. A MS foi operada no modo de impacto de elétron (70eV), varrendo entre m/z 30 e 350. Os compostos foram identificados pela comparação de tempos de retenção e espectros de massa com aqueles de compostos de referência. Os compostos foram quantificados pela Corrente de Íon Total (TIC) registrada. Os dados foram analisados pelo software BrukerMSWorkstation. As concentrações de álcoois graxos foram calculadas com base nos padrões internos (Figura 6).

[00375] Todas as cepas expressando a $\Delta 11$ dessaturase da $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* (Atrd11) e a acil-CoA graxa redutase de *Heliothis subflexa* (HsFAR) produziram (Z)11-16:OH. Quando do estudo dos nocautes de gene único, os efeitos mais proeminentes foram observados para os nocautes de FAO1 e PEX10 (melhora de 265 e 406 % nos álcoois graxos dessaturados). As deleções duplas foram muito mais eficazes, por exemplo, o nocaute tanto de FAO1 quanto de PEX10 deu aumento de 877 % no título do álcool graxo dessaturado, enquanto que a combinação da infra-regulagem de GPAT e nocaute de PEX10 deram um aumento de 1083 %. A combinação de diversos dos tratamentos bem sucedidos levou a 1475% de aumento no título de álcoois graxos dessaturados.

Exemplo 4: Produção de álcoois graxos nas fermentações controladas

[00376] As fermentações foram realizadas em um biorreator BioFlo 415 (Eppendorf/New Brunswick), equipado com um vaso de 14 L (volume máximo de trabalho 10 L). O pH foi controlado a $5,0 \pm 0,1$ com a adição automatizada de uma solução 2N de H₂SO₄ e uma solução 4N de NaOH. O oxigênio dissolvido foi medido usando um eletrodo polarográfico e automaticamente controlado a 20% de saturação mudando-se a velocidade de agitação de três turbinas Rushton de 6 lâminas. A cepa *Yarrowia lipolytica* ST6379 foi inoculada no meio de fermentação (2 g/L de extrato de levedura, 13,4 g/L de base nitrogenada de levedura, 0,76 g/L de lisina, 0,76 g/L de

uracila, 0,024 mg/L de tiamina, 0,002 g/L de biotina, e 50 g/L de glicerol). Depois de 25 horas de fermentação, o meio de fermentação (6 L) foi suplementado com 750 ml alimentação rica em nutriente (que foi composta de 16,2 g/L de extrato de levedura, 108,6 g/L de base nitrogenada de levedura, 6,2 g/L de lisina, 0,2 mg/L de tiamina, 0,02 g/L de biotina, e 326 g/L de glicerol), seguido por um pulso de glicerol para uma concentração de 50 g/L no reator em 32 h. A partir de 36 horas glicerol foi alimentado continuamente mantendo uma concentração de glicerol constante de 20 a 30 g/L. A fermentação durou um total de 48 horas. As concentrações de álcool graxo no final da fermentação são dadas na Tabela 6.

[00377] No total 2,86 g/L de álcoois graxos dessaturados foram produzidos.

Tabela 6: Produção de álcoois graxos pela cepa ST6379

| Cepa | Álcoois graxos (g/L) | | | |
|--------|----------------------|-------|------------|-------------|
| | 14:OH | 16:OH | (Z)9-16:OH | (Z)11-16:OH |
| ST6379 | 0,116 | 2,265 | 0,290 | 2,570 |

Exemplo 5: Método para produzir feromônios de Lepidópteros

[00378] As cepas ST6527, ST6360 e ST7394 foram cultivadas em meio mínimo como descrito no Exemplo 3. O meio para a cepa ST7394 foi adicionalmente suplementado com 1 g/L de miristato de metila.

[00379] Pela expressão de álcool graxo dessaturases e redutases diferentes, a cepa de levedura da plataforma pôde ser usada para produzir álcoois graxos dessaturados diferentes (Tabela 7).

Tabela 7

| Nome da cepa | Descrição da cepa | Acil-CoA graxa dessaturase | Acil-CoA graxa redutase | Acetiltrans-ferase | Produto |
|--------------|---|----------------------------|-------------------------|---|---|
| ST6527 | $\Delta hfd4$ $\Delta hfd1$ $\Delta Pex10$ $\Delta Fao1$ | Atrd11 | Har_FAR | nenhuma | 46,1 ± 1,4 mg/L Z11-hexadecen-1-ol |
| ST7394 | $\Delta hfd4$ $\Delta hfd1$ $\Delta Pex10$ $\Delta Fao1$ $\Delta hfd2$ $\Delta hfd3$ GPAT↓ | Dmd9 | Har_FAR | Acetiltrans-ferase Atf1 de <i>S. cerevisiae</i> | 24,9 ± 2,5 mg/L acetato de Z9-tetradecen-1-ila |

| | | | | | | |
|--------|---------------------------------|--------------------------------|--|-------------------|---|---|
| ST6360 | Δ hfd4 Δ Pex10 | Δ hfd1 Δ Fao1 | Atrd11 dessaturase de <i>Spodoptera litura</i> | Har_FAR Hs_FAR | Acetiltrans-ferase Atf1 de <i>S. cerevisiae</i> | 27,5 \pm 0,9 mg/L Z9- tetradecanol 15,2 \pm 0,8 mg/L acetato de Z9- tetradecen-1-il 25,2 \pm 2,0 mg/L Z11-hexadecen- 1-ol |
|--------|---------------------------------|--------------------------------|--|-------------------|---|---|

Exemplo 6: Método para produzir feromônios de Lepidópteros

[00380] Um gene codificando uma acil-CoA graxa dessaturase e um gene codificando uma acil-CoA graxa redutase são expressos em uma célula de *Y. lipolytica* com deleções nos genes *PEX10*, *HFD1*, *HFD4* e *FAO1*, e com expressão reduzida de GPAT. A célula resultante, quando cultivada em meio de fermentação, produz álcoois graxos dessaturados. Estes álcoois graxos são recuperados do caldo e quimicamente oxidados nos aldeídos graxos correspondentes.

[00381] Um gene, codificando uma acil-CoA graxa dessaturase, um gene codificando uma acil-CoA graxa redutase, são expressos em uma célula de *Y. lipolytica* superexpressando uma acetiltransferase, e tendo deleções nos genes *PEX10*, *HFD1*, *HFD4* e *FAO1*, e com expressão reduzida de GPAT. A célula resultante, quando cultivada em meio de fermentação, produz acetatos de álcool graxo dessaturados.

Tabela 8. Os exemplos de combinações de gene e produtos resultantes.

| Acil-CoA dessaturase | graxa | Acil-CoA graxa redutase | Acetiltransferase | Produto |
|--|----------------|--|---|-------------------------------------|
| Δ 11 <i>Amyelois transitella</i> | dessaturase de | Redutase de <i>Helicoverpa armigera</i> | nenhuma | Z11-hexadecen-1-ol |
| Δ 9 <i>Drosophila melanogaster</i> (Fig. 4) | dessaturase de | Redutase de <i>Helicoverpa armigera</i> (Fig. 4) | Acetiltransferase Atf1 de <i>S. cerevisiae</i> (Fig. 5) | Acetato de Z9- tetradecen-1-ila |
| Δ 11 <i>Choristoneura rosaceana</i> | dessaturase de | Redutase de <i>Helicoverpa armigera</i> | Acetiltransferase Atf1 de <i>S. cerevisiae</i> | Acetato de Z11- tetradecen-1-ila |
| Δ 11 <i>Choristoneura parallela</i> | dessaturase de | Redutase de <i>Helicoverpa armigera</i> | Acetiltransferase Atf1 de <i>S. cerevisiae</i> | Acetato de E11- tetradecen-1-ila |

Sequências

[00382] SEQ ID NO: 1 – S. sequência de nucleotídeo *cerevisiae* otimizada no códon de *A. transitella* Δ 11-dessaturase; sequência codificadora de mRNA.

SEQ ID NO: 2 - Sequência de aminoácidos de *A. transitella*

delta-11-dessaturase (tradução)

SEQ ID NO: 3 Sequência de nucleotídeo de aldeído graxo desidrogenase hfd1 de *Y. lipolytica* (YALI0F23793g)

SEQ ID NO: 4: Sequência de aminoácidos de aldeído graxo desidrogenase HFD1 de *Y. lipolytica*

SEQ ID NO: 5: Sequência de nucleotídeo de aldeído graxo desidrogenase hfd4 de *Y. lipolytica* (YALI0B01298g)

SEQ ID NO: 6 Sequência de aminoácidos de aldeído graxo desidrogenase HFD4 de *Y. lipolytica*

SEQ ID NO: 7 Sequência de nucleotídeo de *Y. lipolytica* fator de biogênese de peroxissoma Pex10 (YALI0C01023g) PEX10

SEQ ID NO: 8 Sequência de aminoácidos do fator de biogênese de peroxissoma PEX10 de *Y. lipolytica*

SEQ ID NO: 9 Sequência de nucleotídeo da glicerol-3-fosfato o-aciltransferase gpat de *Y. lipolytica* (YALI0C00209g)

SEQ ID NO: 10 Sequência de aminoácidos de glicerol-3-fosfato o-aciltransferase GPAT de *Y. lipolytica*

SEQ ID NO: 11- *S.* sequência de nucleotídeo *cerevisiae* otimizada no códon de acil redutase graxa de *H. subflexa*; sequência codificadora de mRNA.

SEQ ID NO: 12 - Aminoácido da acil redutase graxa de *H. subflexa*

SEQ ID NO: 13: HarFAR DNA

SEQ ID NO: 14: HarFAR

SEQ ID NO: 15: HasFAR DNA

SEQ ID NO: 16: HasFAR

SEQ ID NO: 17: Dmed9 DNA

SEQ ID NO: 18: Dmed9

SEQ ID NO: 19: Cro_delta11Z

SEQ ID NO: 20: Cpa_delta11E
SEQ ID NO: 21 FAO1 DNA
SEQ ID NO: 22 Fao1 proteína
SEQ ID NO: 23: Ban_FAR DNA
SEQ ID NO: 24: Ban_FAR
SEQ ID NO: 25 PR-141
SEQ ID NO: 26 PR-142
SEQ ID NO: 27 PR-10851 (Atrd11 cassete de expressão _fw)
SEQ ID NO: 28 PR-10853 (Hs_Far cassete de expressão _fw)
SEQ ID NO: 29 PR-10655 (EpiVecIL _fw)
SEQ ID NO: 30 PR-10656 (EpiVecIL _rev)
SEQ ID NO: 31 PR-10702 (Δ Pex10IL_up _fw)
SEQ ID NO: 32 PR-10703 (Δ Pex10IL_up _rev)
SEQ ID NO: 33 PR-10704 (Δ Pex10IL_infra _fw)
SEQ ID NO: 34 PR-10705 (Δ Pex10IL_infra _rev)
SEQ ID NO: 35 PR-10767 (NatMxSynIL-start _rev_novo)
SEQ ID NO: 36 PR-11047 (NatMxSynIL-end _rev_novo)
SEQ ID NO: 37 PR-11110 (cadeia principal da *E. coli* USER
_fw)
SEQ ID NO: 38 PR-11111 (cadeia principal da *E. coli* USER
_rev)
SEQ ID NO: 39 PR-11138 (Hphsyn _fw)
SEQ ID NO: 40 PR-11139 (Hphsyn _rev)
SEQ ID NO: 41 PR-11694 (GPAT_up_USER _fw)
SEQ ID NO: 42 PR-11695 (GPAT_infra_USER_rev)
SEQ ID NO: 43 PR-13494 (Nat-Tcyc-loxP_fw)
SEQ ID NO: 44 PR-13549 (loxP-PrTefIntron _fw)
SEQ ID NO: 45 PR-14269 (UraIL_fw)
SEQ ID NO: 46 PR-14270 (UraIL_rev)

SEQ ID NO: 47 PR-15426 (Δ hfd1_up_fw)

SEQ ID NO: 48 PR-15427 (Δ hfd1_up_rev)

SEQ ID NO: 49 PR-15428 (Δ hfd1_infra_fw)

SEQ ID NO: 50 PR-15429 (Δ hfd1_infra_rev)

SEQ ID NO: 51 PR-15438 (Δ hfd4_up_fw)

SEQ ID NO: 52 PR-15439 (Δ hfd4_up_rev)

SEQ ID NO: 53 PR-15440 (Δ hfd4_infra_fw)

SEQ ID NO: 54 PR-15441 (Δ hfd4_infra_rev)

SEQ ID NO: 55 PR-16463 (Δ Fao1IL_up_fw)

SEQ ID NO: 56 PR-16464 (Δ Fao1IL_up_rev)

SEQ ID NO: 57 PR-16465 (Δ Fao1IL_infra_fw)

SEQ ID NO: 58 PR-16466 (Δ Fao1IL_infra_rev)

SEQ ID NO: 59 PR-16696 (GPAT_up_rev)

SEQ ID NO: 60 PR-16698 (GPAT_100bpPr_infra_fw)

SEQ ID NO: 61 sequência de nucleotídeo *Y. lipolytica* otimizada no códon de álcool acetiltransferase de *S. cerevisiae* ATF1

SEQ ID NO: 62 sequência de aminoácidos de ATF1p da *Saccharomyces cerevisiae*

SEQ ID NO: 63 sequência de nucleotídeo *Y. lipolytica* otimizada no códon da Δ 9 dessaturase de *Drosophila melanogaster* Dmd9

SEQ ID NO: 64 sequência de nucleotídeo otimizada no códon de *Y.lipolytica* da acil redutase graxa de *H. armigera* Har_FAR

SEQ ID NO: 65 sequência de nucleotídeo *Y. lipolytica* otimizada no códon da Δ 9 dessaturase de *Spodoptera litura* Des11

SEQ ID NO: 66 Δ 9 dessaturase de *Spodoptera litura* Des11

SEQ ID NO: 67 sequência de nucleotídeo *Y. lipolytica* otimizada no códon da Δ 11 dessaturase de *Amyelois transitella*

SEQ ID NO: 68 Sequência de aminoácidos da Δ 11 dessaturase de *Amyelois transitella*

SEQ ID NO: 69 sequência de nucleotídeo *Y. lipolytica* otimizada no códon da acil redutase graxa de *Helicoverpa armigera*

SEQ ID NO: 70 Sequência de aminoácidos da acil redutase graxa da *Helicoverpa armigera*

SEQ ID NO: 71 PR-10714

SEQ ID NO: 72 PR-10766

SEQ ID NO: 73 PR-10767

SEQ ID NO: 74 PR-11047

SEQ ID NO: 75 PR-13338

SEQ ID NO: 76 PR-141

SEQ ID NO: 77 PR-14148

SEQ ID NO: 78 PR-14149

SEQ ID NO: 79 PR-142

SEQ ID NO: 80 PR-14565

SEQ ID NO: 81 PR-14566

SEQ ID NO: 82 PR-14567

SEQ ID NO: 83 PR-14568

SEQ ID NO: 84 PR-14589

SEQ ID NO: 85 PR-14590

SEQ ID NO: 86 PR-14591

SEQ ID NO: 87 PR-14592

SEQ ID NO: 88 PR-15430

SEQ ID NO: 89 PR-15431

SEQ ID NO: 90 PR-15432

SEQ ID NO: 91 PR-15433

SEQ ID NO: 92 PR-15434

SEQ ID NO: 93 PR-15435

SEQ ID NO: 94 PR-15436

SEQ ID NO: 95 PR-15437

| | |
|----------------|----------|
| SEQ ID NO: 96 | PR-15930 |
| SEQ ID NO: 97 | PR-16592 |
| SEQ ID NO: 98 | PR-16593 |
| SEQ ID NO: 99 | PR-16594 |
| SEQ ID NO: 100 | PR-16595 |
| SEQ ID NO: 101 | PR-14149 |
| SEQ ID NO: 102 | PR-14279 |
| SEQ ID NO: 103 | PR-14395 |
| SEQ ID NO: 104 | PR-14396 |
| SEQ ID NO: 105 | PR-14397 |
| SEQ ID NO: 106 | PR-14398 |
| SEQ ID NO: 107 | PR-15521 |
| SEQ ID NO: 108 | PR-15522 |
| SEQ ID NO: 109 | PR-18486 |
| SEQ ID NO: 110 | PR-18487 |
| SEQ ID NO: 111 | PR-18490 |
| SEQ ID NO: 112 | PR-18489 |
| SEQ ID NO: 113 | PR-18499 |
| SEQ ID NO: 114 | PR-18500 |

Referências

- [00383] Alfaro, Navarro-Llopis, Primo, 2009. Optimization of pheromone dispenser density for managing the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker), by mating disruption. *Crop Protection*. 28:567-572.
- [00384] Angerer, Radermacher, Mankowska, Steger, Zwicker, Heide, Wittig, Brandt, Zickermann, 2014. The LYR protein subunit NB4M/NDUFA6 of mitochondrial complex I anchors an acyl carrier protein and is essential for catalytic activity. *PNAS*. 111(14)
- [00385] Bari, 2003. Development of pheromone mating disruption strategies for the suppression of the artichoke plume moth in artichokes

grown on the central coast of California. ISHS Acta Horticulturae 660: V International Congress on Artichoke. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.660.80

[00386] Chen, Beckerich, Gaillardin, 1997. One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol. 48(2):232-5

[00387] Eizaguirre, Sans, López, Albajes. 2002. Effects of mating disruption against the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, on the European corn borer *Ostrinia*

[00388] *nubilalis*. Use of pheromones and other semiochemicals in integrated production

[00389] IOBC wprs Bulletin.

[00390] Ferrell, Yao, 1972. Reductive and oxidative synthesis of saturated and unsaturated fatty aldehydes, J Lipid Res. 13(1):23-6.).

[00391] Iwama R, Kobayashi S, Ohta A, Horiuchi H, Fukuda R. 2014; 289(48):33275-86. J Biol Chem. Fatty aldehyde dehydrogenase multigene family involved in the assimilation of n-alkanes in *Yarrowia lipolytica*.

[00392] Jensen, Strucko, Kildegaard, David, Maury, Mortensen, Forster, Nielsen, Borodina, 2014. EasyClone: method for iterative chromosomal integration of multiple genes in *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Yeast Res. 14(2):238-48

[00393] Iwama R, Kobayashi S, Ohta A, Horiuchi H, Fukuda R. FEMS Yeast Res. 2015 May;15(3). Alcohol dehydrogenases and an alcohol oxidase involved in the assimilation of exogenous fatty alcohols in *Yarrowia lipolytica*.

[00394] Kehat, Dunkelblum, 1993. Sex Pheromones: achievements in monitoring and mating disruption of cotton pests in Israel, Achieves of Insect Biochemistry and Physiology. 22:425-431.

[00395] Li, Zhang, 2009. An environmentally benign TEMPO-catalyzed efficient alcohol oxidation system with a recyclable hypervalent

iodine(III) reagent and its facile preparation. *Synthesis*, 1163-1169a.

[00396] Meyer, Schreiber, 1994. Acceleration of the Dess-Martin oxidation by water *J. Org. Chem.*, 59, 7549-7552;

[00397] Okada, Asawa, Sugiyama, Kirihara, Iwai, Kimura, 2014. Sodium hypochlorite pentahydrate (NaOCl·5H₂O) crystals as an extraordinary oxidant for primary and secondary alcohols. *Synlett*, 25, 596-598.

[00398] Steves J.E. and Stahl S.S., 2013. Copper(I)/ABNO-catalyzed aerobic alcohol oxidation: alleviating steric and electronic constraints of Cu/TEMPO catalyst systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 15742-15745

[00399] Stovicek V, Borja GM, Forster J, Borodina I. EasyClone 2.0: expanded toolkit of integrative vectors for stable gene expression in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2015 Nov;42(11):1519-31.

[00400] Sumita T, Iida T, Hirata A, Horiuchi H, Takagi M, Ohta A. (2002) *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Aug 27;214(1):31-8. "Peroxisome deficiency represses the expression of n-alkane-inducible YIALK1 encoding cytochrome P450ALK1 in *Yarrowia lipolytica*."

[00401] Tamura, Aoyama, Takido, Kodomari, 2012. Novel [4-Hydroxy-TEMPO + NaCl]/SiO₂ as a reusable catalyst for aerobic oxidation of alcohols to carbonyls. *Synlett*, 23, 1397-1407.

[00402] Yadav, Reddy, Basak, Narsaiah, 2004. Recyclable 2nd generation ionic liquids as green solvents for the oxidation of alcohols with hypervalent iodine reagents, *Tetrahedron*, 60, 2131-2135.

[00403] Wu, Zhang, Yao, Xu, Wang and Zhang, 2012. Management of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) by mating disruption. *Insect Science* 19 (6), 643–648.

Itens

[00404] 1. Uma célula de levedura oleagínosa capaz de produzir um álcool graxo dessaturado, a dita célula:

i) expressando pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressando pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) tendo atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou tendo atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00405] 2. A célula de levedura de acordo com o item 1, em que a célula de levedura tem atividade reduzida de Pex10 (SEQ ID NO: 8) e de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID

NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), ou atividade reduzida de Pex10 (SEQ ID NO: 8) e pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8) e pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00406] 3. A célula de levedura de acordo com o item 2, em que a levedura é da espécie *Yarrowia*, preferivelmente a levedura é *Yarrowia lipolytica*.

[00407] 4. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a pelo menos uma dessaturase heteróloga é selecionada a partir do grupo que consiste em uma $\Delta 3$ dessaturase, uma $\Delta 5$ dessaturase, uma $\Delta 6$ dessaturase, uma $\Delta 7$ dessaturase, uma $\Delta 8$ dessaturase, uma $\Delta 9$ dessaturase, uma $\Delta 10$ dessaturase, uma $\Delta 11$ dessaturase, uma $\Delta 12$ dessaturase, uma $\Delta 13$ dessaturase e uma $\Delta 14$ dessaturase.

[00408] 5. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a redução na atividade de Hfd1, Hfd4, Pex10 e Fao1 ou

uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com estas é parcial ou total, e/ou em que a redução na atividade de GPAT ou de uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para esta é parcial.

[00409] 6. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a dessaturase é derivada de um organismo de um inseto, tal como da ordem *Lepidoptera*.

[00410] 7. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a dessaturase é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2.

[00411] 8. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a dessaturase é uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18.

[00412] 9. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a dessaturase é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura rosaceana* como apresentada na SEQ ID NO: 19.

[00413] 10. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a dessaturase é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Choristoneura parallela* como apresentada na SEQ ID NO: 20.

[00414] 11. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a FAR é selecionada dentre:

i) uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14;

ii) uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16;

iii) uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR

de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

iv) uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24.

[00415] 12. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, expressando ainda uma acetiltransferase capaz de converter pelo menos parte do dito álcool graxo dessaturado para um acetato de acila graxo dessaturado.

[00416] 13. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que pelo menos um dos genes codificando uma dessaturase, uma acil-CoA graxa redutase ou uma acetiltransferase está presente em número de cópia alto.

[00417] 14. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que pelo menos um dos genes codificando uma dessaturase, uma acil-CoA graxa redutase ou uma acetiltransferase está sob o controle de um promotor indutível.

[00418] 15. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que pelo menos um dos genes codificando uma dessaturase, uma acil-CoA graxa redutase ou uma acetiltransferase é otimizada no códon para a dita célula de levedura.

[00419] 16. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que o genes codificando uma dessaturase, uma acil-CoA graxa redutase ou uma acetiltransferase são compreendidos dentro do genoma da célula ou dentro de um vetor compreendido dentro da célula.

[00420] 17. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a célula compreende uma deleção ou uma mutação de pelo menos uma de *HfD1* (SEQ ID NO: 3), *HFD4* (SEQ ID NO: 5), *PEX10* (SEQ ID NO: 7), *FAO1* (SEQ ID NO: 21) e/ou uma mutação de *GPAT* (SEQ ID NO: 9), ou uma deleção ou uma mutação em pelo menos uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos 60% de homologia com estas, tal como

pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com estas, que resulta na redução de atividade de pelo menos uma de Hfd1, Hfd4, Pex10, Fao1 e GPAT.

[00421] 18. A célula de levedura de acordo com o item 17, compreendendo uma mutação em *PEX10* (SEQ ID NO: 7) e pelo menos uma em *Hfd1* (SEQ ID NO: 3), *HFD4* (SEQ ID NO: 5), *FAO1* (SEQ ID NO: 21) e/ou *GPAT* (SEQ ID NO: 9) ou um homólogo das mesmas.

[00422] 19. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que *HFD1* (SEQ ID NO: 3), *HFD4* (SEQ ID NO: 5), *PEX10* (SEQ ID NO: 7) e/ou *FAO1* (SEQ ID NO: 21) ou um homólogo das mesmas tendo pelo menos 60% de homologia com estas é deletada ou mutada, que resulta na perda total de atividade de Hfd1, Hfd4, Pex10 e/ou Fao1, e/ou em que *GPAT* (SEQ ID NO: 9) ou um homólogo das mesmas tendo pelo menos 60% de homologia com estas é mutada, que resulta na atividade reduzida de GPAT.

[00423] 20. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a célula tem atividade reduzida ou perda total de

atividade de pelo menos duas de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00424] 21. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a célula tem atividade reduzida ou perda total de atividade de pelo menos três de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00425] 22. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a célula tem atividade reduzida ou perda total de atividade de quatro de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00426] 23. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a célula tem atividade reduzida ou perda total de atividade de todas de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00427] 24. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a acil-CoA graxa redutase é codificada por uma sequência de ácido nucleico idêntica a ou tendo pelo menos 90% de homologia com a SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 ou SEQ ID NO: 15, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia, tal como 100% de homologia com a SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 ou SEQ ID NO: 15.

[00428] 25. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a célula é capaz de produzir álcoois graxos com um título total de pelo menos 1 mg/L, tal como pelo menos 5 mg/L, tal como pelo

menos 10 mg/L, tal como pelo menos 25 mg/L, tal como pelo menos 50 mg/L, tal como pelo menos 100 mg/L, tal como pelo menos 250 mg/L, tal como pelo menos 500 mg/L, tal como pelo menos 1 g/L, tal como pelo menos 2 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 4 g/L, tal como pelo menos 5 g/L, tal como pelo menos 6 g/L, tal como pelo menos 7 g/L, tal como pelo menos 8 g/L, tal como pelo menos 9 g/L, tal como pelo menos 10 g/L, em que o título total é a soma do título de álcoois graxos dessaturados e o título de álcoois graxos saturados.

[00429] 26. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que os álcoois graxos dessaturados produzidos pela célula representam pelo menos 20% dos álcoois graxos totais produzidos pela célula, tal como pelo menos 30%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 50%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 70%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 90% dos álcoois graxos totais produzidos pela célula.

[00430] 27. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a célula é capaz de produzir (Z)11-C16:OH com um título de pelo menos 0,5 mg/L, tal como pelo menos 1 mg/L, tal como pelo menos 5 mg/L, tal como pelo menos 10 mg/L, tal como pelo menos 25 mg/L, tal como pelo menos 50 mg/L, tal como pelo menos 100 mg/L, tal como pelo menos 250 mg/L, tal como pelo menos 500 mg/L, tal como pelo menos 1 g/L, tal como pelo menos 2 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 4 g/L, tal como pelo menos 5 g/L, tal como pelo menos 6 g/L, tal como pelo menos 7 g/L, tal como pelo menos 8 g/L, tal como pelo menos 9 g/L, tal como pelo menos 10 g/L de (Z)11-C16:OH.

[00431] 28. A célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que o (Z)11-C16:OH produzido pela célula representa pelo menos 20% dos álcoois graxos totais produzidos pela célula, tal como pelo menos 30%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 50%, tal como

pelo menos 60%, tal como pelo menos 70%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 90% dos álcoois graxos totais produzidos pela célula.

[00432] 29. Um método de produção de um álcool graxo dessaturado e/ou um acetato de acila graxo dessaturado em uma célula de levedura oleagínosa, o dito método compreendendo as etapas de prover uma célula de levedura e incubar a dita célula de levedura em um meio, em que a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa, convertendo deste modo pelo menos parte da dita acil-CoA graxa para uma acil-CoA graxa dessaturada; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado, produzindo deste modo o dito álcool graxo dessaturado; e

iii) tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo

menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00433] 30. O método de acordo com o item 27, em que a célula de levedura tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de Pex10 (SEQ ID NO: 8) e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8) e uma mutação que resulta na atividade reduzida ou pelo menos um de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), , Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 65% de homologia, tal como pelo menos 70% de homologia, tal como pelo menos 75% de homologia, tal como pelo menos 80% de homologia, tal como pelo menos 81% de homologia, tal como pelo menos 82% de homologia, tal como pelo menos 83% de homologia, tal como pelo menos 84% de homologia, tal como pelo menos 85% de homologia, tal como pelo menos 86% de homologia, tal como pelo menos 87% de homologia, tal como pelo menos 88% de homologia, tal como pelo menos 89% de homologia, tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Pex10 (SEQ ID NO: 8) e pelo menos

uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00434] 31. O método de acordo com qualquer um dos itens de 29 a 30, em que a célula de levedura é como definida em qualquer um dos itens de 1 a 29.

[00435] 32. O método de acordo com qualquer um dos itens de 29 a 31, compreendendo ainda a etapa de converter o álcool graxo dessaturado da etapa ii) em um acetato de acila graxo ou um aldeído graxo.

[00436] 33. O método de acordo com qualquer um dos itens de 29 a 32, compreendendo ainda a etapa de recuperar o álcool graxo dessaturado, o acetato de acila graxo e/ou o aldeído.

[00437] 34. O método de acordo com qualquer um dos itens de 29 a 33, compreendendo ainda a etapa de formular o álcool graxo dessaturado, o acetato de acila graxo e/ou o aldeído em uma composição de feromônio.

[00438] 35. O método de acordo com qualquer um dos itens de 29 a 34, em que a composição de feromônio compreende ainda um ou mais compostos adicionais tais como um carreador ou substrato líquidos ou sólidos.

[00439] 36. O método de acordo com qualquer um dos itens de 29 a 33, em que pelo menos parte do álcool graxo dessaturado é Z11-16:OH.

[00440] 37. Construção de ácido nucleico para modificar uma célula de levedura, a dita construção compreendendo:

i) um primeiro polinucleotídeo codificando pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) um segundo polinucleotídeo codificando pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga (FAR), capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

opcionalmente, polinucleotídeos adicionais para reduzir a atividade de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO:

6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 60% de homologia para uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10),

em que opcionalmente o primeiro polinucleotídeo e/ou o segundo polinucleotídeo e/ou os polinucleotídeos adicionais estão sob o controle de um promotor.

[00441] 38. A construção de ácido nucleico de acordo com o item 37, compreendendo ainda um terceiro polinucleotídeo codificando pelo menos uma acetiltransferase capaz de converter pelo menos parte do dito álcool graxo dessaturado para um acetato de acila graxo dessaturado.

[00442] 39. Kit de partes compreendendo:

a) a célula de levedura de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 28 e instruções para o uso; e/ou

b) uma construção de ácido nucleico de acordo com qualquer um dos itens 37 ou 38, em que a dita construção é para modificar uma célula de levedura, e

c) opcionalmente a célula de levedura a ser modificada.

[00443] 40. Kit de partes de acordo com o item 39, em que a célula de levedura a ser modificada tem atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8), Fao1 (SEQ ID NO: 22) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

[00444] 41. Um álcool graxo dessaturado, um acetato de acila graxo dessaturado ou um aldeído graxo dessaturado obtenível pelo método de acordo com qualquer um dos itens de 29 a 36.

[00445] 42. Uso de um álcool graxo dessaturado, um acetato de acila graxo dessaturado ou um aldeído graxo dessaturado obtenível pelo método de acordo com qualquer um dos itens de 29 a 36.

REIVINDICAÇÕES

1. Célula de levedura oleaginosa capaz de produzir um álcool graxo dessaturado, caracterizada pelo fato de que a dita célula:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de Fao1 (SEQ ID NO: 22) e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 90% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22) e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22) e pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8) e GPAT (SEQ ID NO: 10),

em que a célula é capaz de produzir álcoois graxos dessaturados com um título de pelo menos 5 mg/L, tal como pelo menos 10 mg/L, tal como pelo menos 25 mg/L, tal como pelo menos 50 mg/L, tal como pelo menos 100 mg/L, tal como pelo menos 250 mg/L, tal como pelo menos 500 mg/L, tal como pelo menos 1 g/L, tal como pelo menos 2 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 4 g/L, tal

como pelo menos 5 g/L, tal como pelo menos 6 g/L, tal como pelo menos 7 g/L, tal como pelo menos 8 g/L, tal como pelo menos 9 g/L, tal como pelo menos 10 g/L.

2. Célula de levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de Fao1 (SEQ ID NO: 22) ou uma proteína tendo pelo menos 90% de homologia com estas e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4) e Pex10 (SEQ ID NO: 8) ou uma proteína tendo pelo menos 90% de homologia com estas.

3. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de Fao1 (SEQ ID NO: 22) ou uma proteína tendo pelo menos 90 % de homologia com estas, e uma mutação que resulta na atividade reduzida de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8) e GPA (SEQ ID NO: 10) ou proteínas tendo pelo menos 90% de homologia com estas.

4. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a levedura é da espécie *Yarrowia*, preferivelmente a levedura é *Yarrowia lipolytica*.

5. Célula de levedura de acordo com a reivindicação precedente, caracterizada pelo fato de que a pelo menos uma dessaturase heteróloga é selecionada a partir do grupo que consiste em uma $\Delta 3$ dessaturase, uma $\Delta 5$ dessaturase, uma $\Delta 6$ dessaturase, uma $\Delta 7$ dessaturase, uma $\Delta 8$ dessaturase, uma $\Delta 9$ dessaturase, uma $\Delta 10$ dessaturase, uma $\Delta 11$ dessaturase, uma $\Delta 12$ dessaturase, uma $\Delta 13$ dessaturase e uma $\Delta 14$ dessaturase.

6. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a redução na atividade de Hfd1, Hfd4, Pex10 e Fao1 ou uma proteína tendo pelo menos

90% de homologia com estas é parcial ou total, e/ou em que a redução na atividade de GPAT ou uma proteína tendo pelo menos 90% de homologia com estas é parcial.

7. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a dessaturase é derivada de um organismo de um inseto, tal como da ordem *Lepidoptera*, preferivelmente a dessaturase é uma $\Delta 11$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 11$ dessaturase de *Amyelois transitella* como apresentada na SEQ ID NO: 2 ou uma $\Delta 9$ dessaturase tendo pelo menos 60% de homologia com a $\Delta 9$ dessaturase de *Drosophila melanogaster* como apresentada na SEQ ID NO: 18.

8. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a FAR é selecionada dentre:

i) uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14;

ii) uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa assulta* como apresentada na SEQ ID NO: 16;

iii) uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID NO: 12; e

iv) uma FAR tendo pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Bicyclus anynana* como apresentada na SEQ ID NO: 24,

9. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a FAR tem pelo menos 80% de homologia com a FAR de *Helicoverpa armigera* como apresentada na SEQ ID NO: 14 ou a FAR de *Heliothis subflexa* como apresentada na SEQ ID: 12.

10. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que expressa ainda uma

acetiltransferase capaz de converter pelo menos parte do dito álcool graxo dessaturado para um acetato de acila graxo dessaturado.

11. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a célula é capaz de produzir álcoois graxos com um título total de pelo menos 5 mg/L, tal como pelo menos 10 mg/L, tal como pelo menos 25 mg/L, tal como pelo menos 50 mg/L, tal como pelo menos 100 mg/L, tal como pelo menos 250 mg/L, tal como pelo menos 500 mg/L, tal como pelo menos 1 g/L, tal como pelo menos 2 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 4 g/L, tal como pelo menos 5 g/L, tal como pelo menos 6 g/L, tal como pelo menos 7 g/L, tal como pelo menos 8 g/L, tal como pelo menos 9 g/L, tal como pelo menos 10 g/L, em que o título total é a soma do título de álcoois graxos dessaturados e o título de álcoois graxos saturados.

12. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a célula é capaz de produzir (Z)11-C16:OH com um título de pelo menos 0,5 mg/L, tal como pelo menos 1 mg/L, tal como pelo menos 5 mg/L, tal como pelo menos 10 mg/L, tal como pelo menos 25 mg/L, tal como pelo menos 50 mg/L, tal como pelo menos 100 mg/L, tal como pelo menos 250 mg/L, tal como pelo menos 500 mg/L, tal como pelo menos 1 g/L, tal como pelo menos 2 g/L, tal como pelo menos 3 g/L, tal como pelo menos 4 g/L, tal como pelo menos 5 g/L, tal como pelo menos 6 g/L, tal como pelo menos 7 g/L, tal como pelo menos 8 g/L, tal como pelo menos 9 g/L, tal como pelo menos 10 g/L (Z)11-C16:OH.

13. Método de produção de um álcool graxo dessaturado em uma célula de levedura oleaginosa com um título de pelo menos 5 mg/L, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende as etapas de prover uma célula de levedura e incubar a dita célula de levedura em um meio, em que a célula de levedura:

i) expressa pelo menos uma dessaturase heteróloga capaz de

introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa, convertendo deste modo pelo menos parte da dita acil-CoA graxa para uma acil-CoA graxa dessaturada; e

ii) expressa pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga, capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado, produzindo deste modo o dito álcool graxo dessaturado; e

iii) tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de Fao1 (SEQ ID NO: 22) e uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou tem uma mutação que resulta na atividade reduzida de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 90% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22) e uma mutação que resulta na atividade reduzida ou pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8) e GPAT (SEQ ID NO: 10), tal como pelo menos 90% de homologia, tal como pelo menos 91% de homologia, tal como pelo menos 92% de homologia, tal como pelo menos 93% de homologia, tal como pelo menos 94% de homologia, tal como pelo menos 95% de homologia, tal como pelo menos 96% de homologia, tal como pelo menos 97% de homologia, tal como pelo menos 98% de homologia, tal como pelo menos 99% de homologia com a Fao1 (SEQ ID NO: 22) e pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8) e GPAT (SEQ ID NO: 10).

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a célula de levedura é como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 12.

15. Construção de ácido nucleico para modificar uma célula de levedura, caracterizada pelo fato de que a dita construção compreende:

i) um primeiro polinucleotídeo codificando pelo menos uma

dessaturase heteróloga capaz de introduzir pelo menos uma ligação dupla em uma acil-CoA graxa; e

ii) um segundo polinucleotídeo codificando pelo menos uma acil-CoA graxa redutase heteróloga (FAR), capaz de converter pelo menos parte da dita acil-CoA graxa dessaturada para um álcool graxo dessaturado; e

iii) polinucleotídeos adicionais para reduzir a atividade de pelo menos uma de Fao1 (SEQ ID NO: 22) ou de pelo menos uma proteína tendo pelo menos 90% de homologia para Fao1 (SEQ ID NO: 22); preferivelmente para reduzir atividade de pelo menos Fao1 (SEQ ID NO: 22) ou uma proteína tendo pelo menos 90% de homologia com estas e para reduzir a atividade de pelo menos uma de Hfd1 (SEQ ID NO: 4), Hfd4 (SEQ ID NO: 6), Pex10 (SEQ ID NO: 8) e GPAT (SEQ ID NO: 10) ou uma proteína tendo pelo menos 90% de homologia com estas;

em que opcionalmente o primeiro polinucleotídeo e/ou o segundo polinucleotídeo e/ou os polinucleotídeos adicionais estão sob o controle de um promotor.

16. Kit de partes, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) a célula de levedura como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 e instruções para o uso; e/ou

b) uma construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 15, em que a dita construção é para modificar uma célula de levedura, e

c) opcionalmente a célula de levedura a ser modificada.

FIG. 1

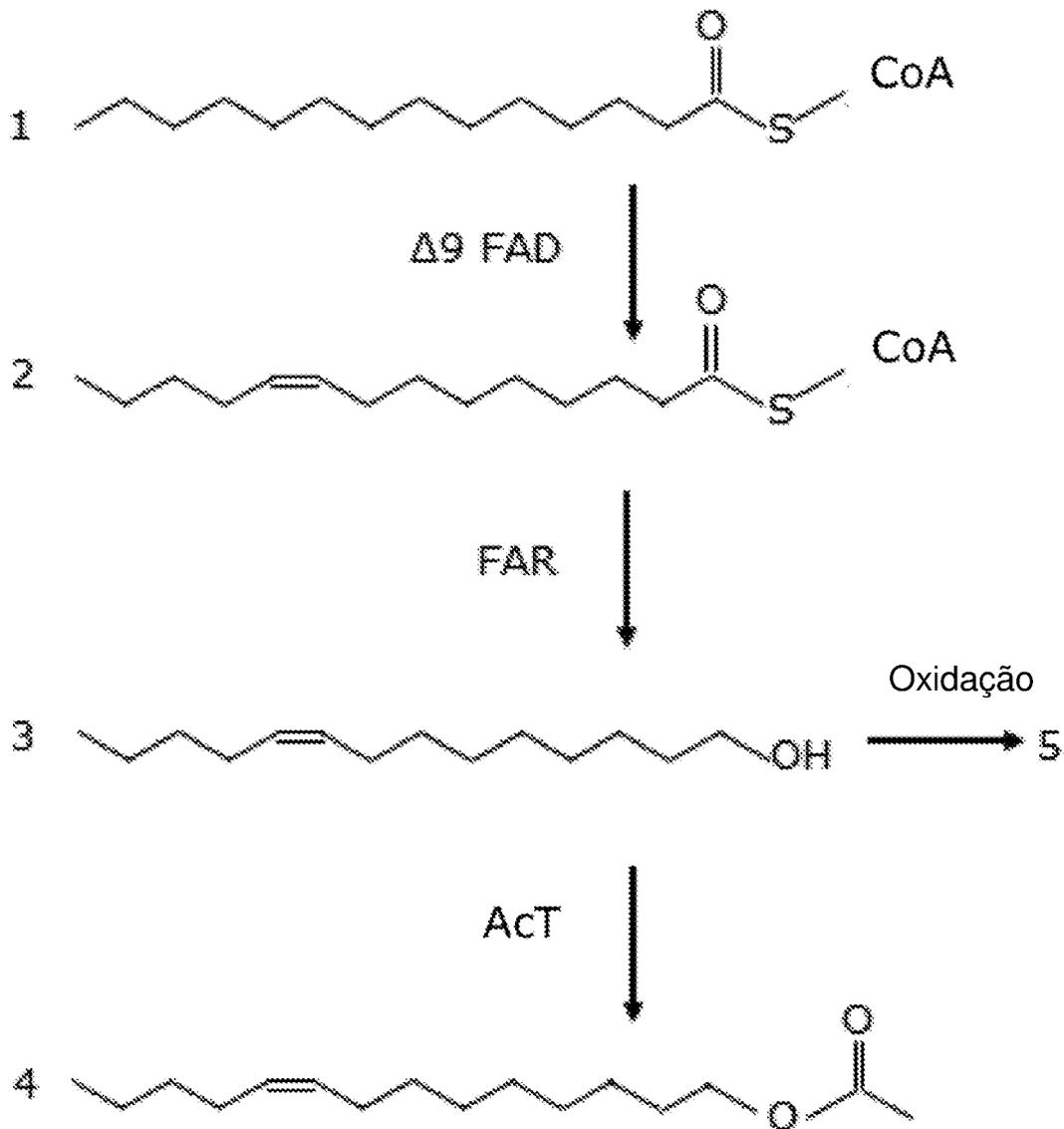


FIG. 2

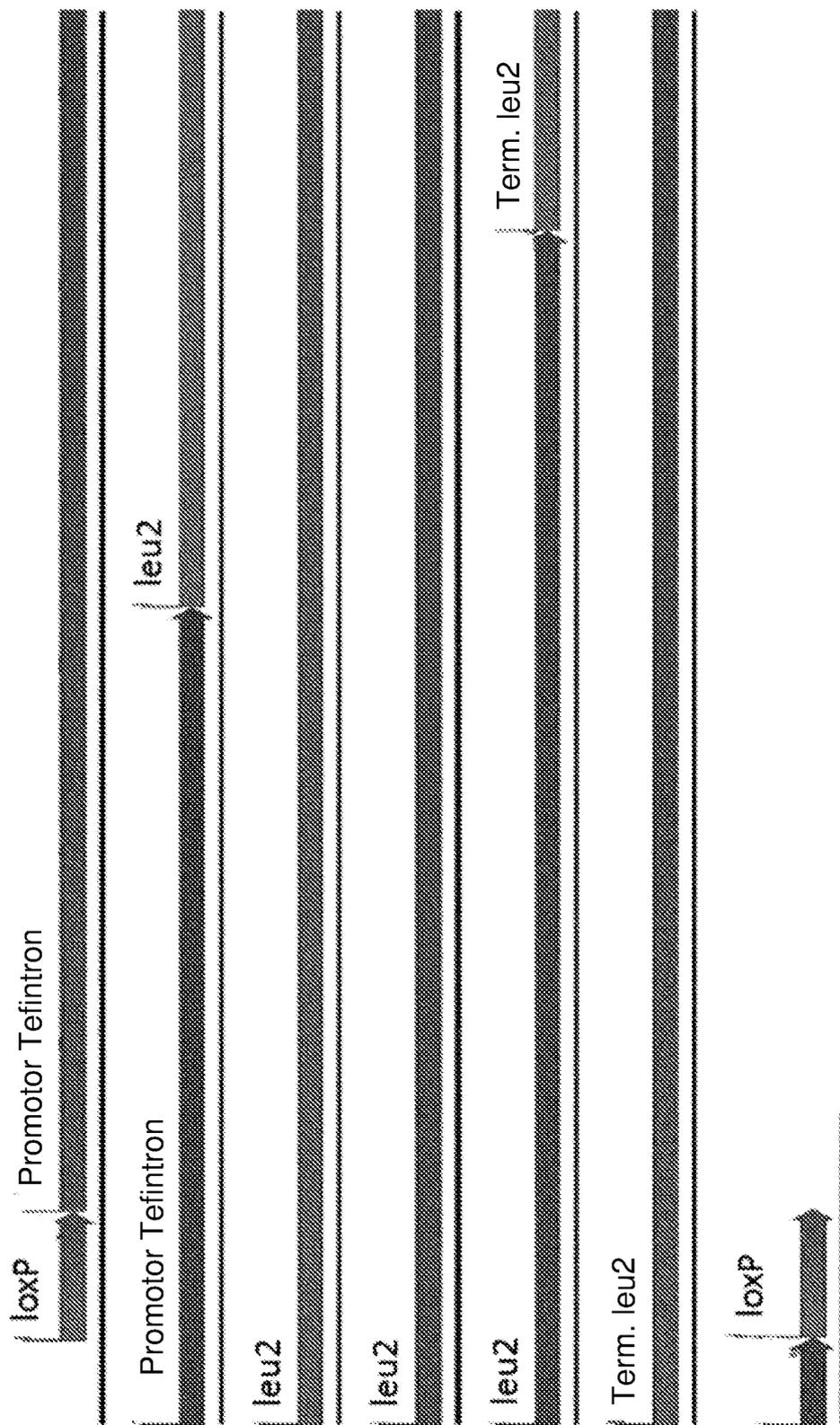


FIG. 3

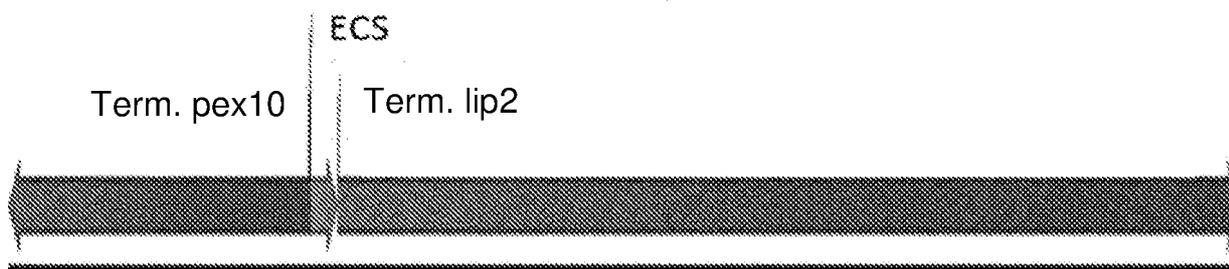


FIG. 4

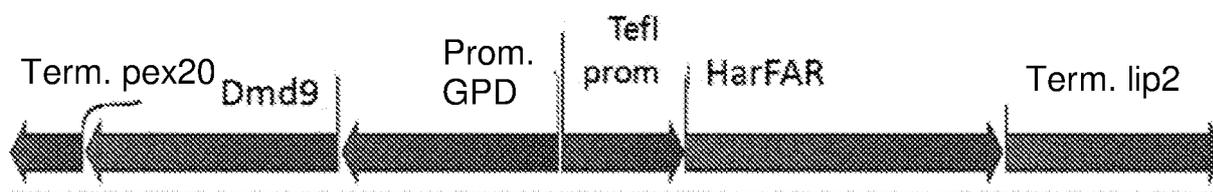


FIG. 5

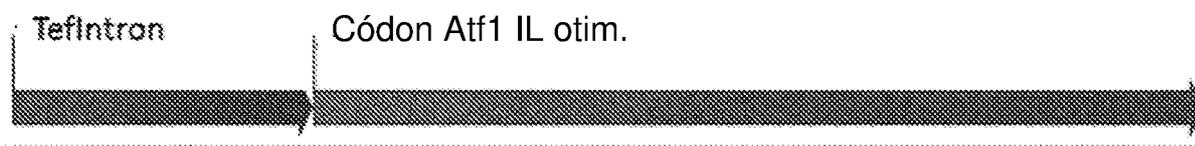
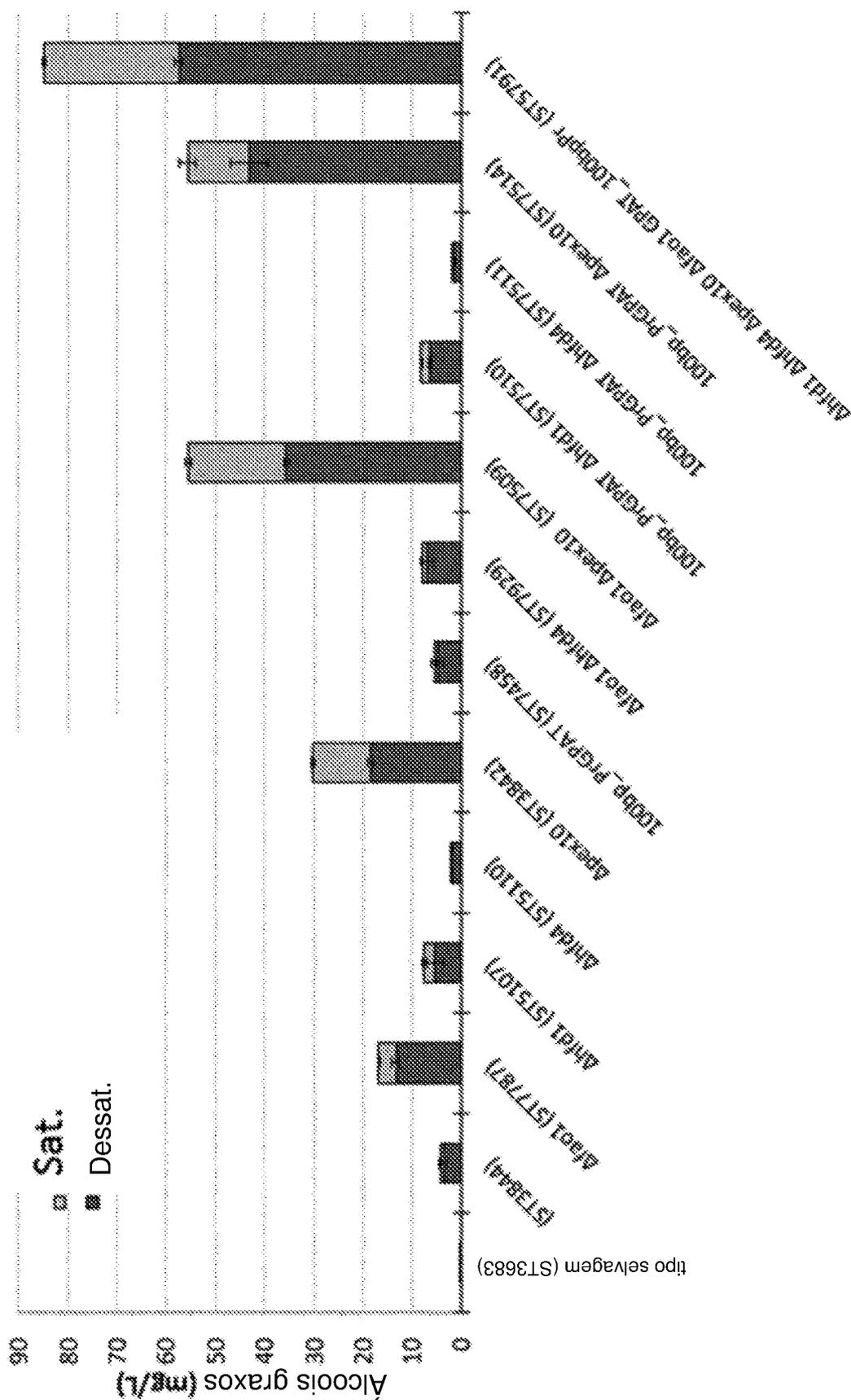


FIG. 6



tipo selvagem (S73683)

RESUMO

CÉLULA DE LEVEDURA OLEAGINOSA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ÁLCOOL GRAXO DESSATURADO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, E, KIT DE PARTES

A presente invenção refere-se às células de levedura oleaginosas para a produção de álcoois graxos e derivados dos mesmos, em particular álcoois graxos dessaturados, acetatos de acila graxos dessaturados e aldeídos graxos dessaturados. Também são providos métodos para a obtenção de tais compostos, que são úteis nas composições de feromônio.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P138605list.seq.txt
- Data de Geração do Código: 14/06/2019
- Hora de Geração do Código: 14:11:40
- Código de Controle:
 - Campo 1: 475DD9B5C4692F3B
 - Campo 2: 84DBA821BE49A006