

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual  
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional  
01 de Fevereiro de 2018 (01.02.2018) WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional  
WO 2018/018111 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes:

C12N 15/53 (2006.01) C12P 7/10 (2006.01)  
C12N 15/81 (2006.01) C12R 1/85 (2006.01)  
C12N 1/19 (2006.01) C12R 1/865 (2006.01)  
C12N 1/22 (2006.01)

PEREIRA, Gonçalo Amarante Guimarães; Rua Dr. Lau-ro Pimentel, 323, Bairro Cidade Universitária, Parte II - Distrito de Barão Geraldo, CEP: 13083-250 - Campinas - SP (BR). PIROLLA, Renan Augusto Siqueira; Rua Baronesa Geraldo de Resende, JD. Nossa Senhora Auxiliadora, CEO: 13075-250 - Campinas - SP (BR).

(21) Número do Pedido Internacional:

PCT/BR2017/000064

(74) Mandatário: SILVADO, Fernanda Lavras Costallat; Rua Roxo Moreira 1831 - Cidade Universitária, "Zeferino Vaz" - Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6.131 -, CEP: 13083-970 - Campinas - SP (BR).

(22) Data do Depósito Internacional:

26 de Junho de 2017 (26.06.2017)

(25) Língua de Depósito Internacional:

Português

(26) Língua de Publicação:

Português

(30) Dados Relativos à Prioridade:

BR 10 2016 017560 7  
28 de Julho de 2016 (28.07.2016) BR

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Requerente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP [BR/BR]; Rua Roxo Moreira 1831 - Cidade Universitária, "Zeferino Vaz" - Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6.131, Campinas - SP - CEP: 13083-970 (BR).

(72) Inventores: DOS SANTOS, Leandro Vieira; Rua Estrela Três Marias, 85, CEP: 13085-210 - Campinas - SP (BR).

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes): ARIPO (BW, GH,

(54) Title: INDUSTRIAL YEAST LUY127 GENETICALLY MODIFIED VIA THE OXY-REDUCTIVE XYLOSE CONVERSION PATHWAY, GENETIC EXPRESSION CARTRIDGES, METHOD FOR OBTAINING ETHANOL 2G AND USE OF THE YEAST LUY127

(54) Título: LEVEDURA INDUSTRIAL GENETICAMENTE MODIFICADA LUY127 COM A VIA OXI-REDUTIVA DE CONVERSÃO DE XILOSE, CASSETES DE EXPRESSÃO GÊNICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL 2G E USO DA LEVEDURA LUY127

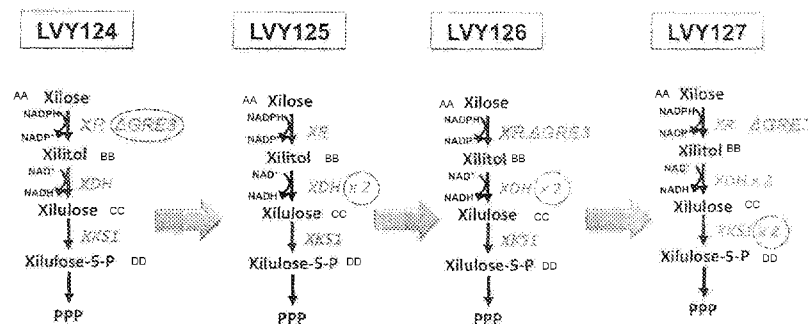


Figura 1

AA Xylose  
BB Xylitol  
CC Xylulose  
DD Xylulose-5-P

(57) Abstract: The present invention relates to industrial yeast LUY127 genetically modified via the oxy-reductive xylose conversion pathway, to genetic expression cartridges, to a method for obtaining ethanol 2G and to the use of the yeast LUY127.

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a levedura industrial geneticamente modificada LUY127 com a via oxi-redutiva de conversão de xilose, cassetes de expressão gênica, processo de obtenção de etanol 2G e uso da levedura LUY127.

(Continua na página seguinte)

WO 2018/018111 A1

GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicado:**

- *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*
- *com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))*

LEVEDURA INDUSTRIAL GENETICAMENTE MODIFICADA LVY127 COM A VIA OXI-REDUTIVA DE CONVERSÃO DE XILOSE, CASSETES DE EXPRESSÃO GÊNICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL 2G E USO DA LEVEDURA LVY127

#### CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção refere-se a levedura industrial geneticamente modificada LVY127 com a via oxi-redutiva de conversão de xilose, cassetes de expressão gênica, processo de obtenção de etanol 2G e uso da levedura LVY127.

[2] A invenção tem aplicação no setor de produção de etanol 2G.

#### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[3] Estados Unidos e Brasil são os dois principais produtores mundiais de etanol, responsáveis, respectivamente, por 40 e 27 bilhões de litros de etanol produzidos em 2009 (Perrone et al., 2010). O etanol pode ser produzido a partir de diferentes fontes de matérias-primas, como milho, beterraba, trigo, cana-de-açúcar, entre outros. O processo de produção de etanol no Brasil utiliza essencialmente a cana-de-açúcar como matéria-prima. A alta capacidade produtiva dessa cultura e as condições climáticas apropriadas para o seu plantio no país permitiram a obtenção de um modelo de produção de baixo custo, tornando o Brasil uma referência mundial na produção de etanol.

[4] A obtenção de etanol se dá pela via fermentativa no interior de dornas onde são adicionados o mosto (caldo e melaço de cana-de-açúcar) e uma alta concentração de células de levedura (10-17% m/v). O caldo e melaço são usados como substratos e concentrações de etanol de 8-11% (v/v) são alcançadas em um período de 6-11hs a 32-35°C. Após a fermentação, todo o conteúdo é centrifugado e o mosto fermentado (vinho) segue para as torres de destilação. As células coletadas por centrifugação são tratadas com ácido

sulfúrico e reutilizadas repetidamente em novos ciclos fermentativos, com pelo menos 2 fermentações por dia, em um período de 200-250 dias. O reciclo celular característico do processo brasileiro de produção de etanol utiliza uma alta concentração de células no início da fermentação contribuindo para um reduzido crescimento e alto rendimento em etanol (90-92% do rendimento teórico de conversão) (Basso et al., 2008).

[5] As condições estressantes do processo de produção, como alta concentração de etanol, altas temperaturas, estresse osmótico, acidez e contaminação bacteriana, resultaram no isolamento de leveduras selvagens mais adaptadas e que substituíam as linhagens iniciadoras da fermentação em curtos períodos de 20-30 dias de reciclo celular (Silva-Filho et al., 2005). Basso (2008) analisou 350 isolados quanto a características de interesse industrial desejáveis como floculação, rendimento, velocidade de fermentação, taxa de crescimento, capacidade de reciclo, produção de espuma e capacidade de implantação nas destilarias. Dentre as linhagens selecionadas, destacaram-se PE-2, CAT-1 e BG-1 por apresentarem um desempenho eficiente e a habilidade de competir com as leveduras nativas, sobrevivendo e dominando o processo de fermentação industrial. Em 2008, PE-2 e CAT-1 foram usadas em aproximadamente 150 destilarias, representando 60% do etanol produzido no Brasil (Basso et al., 2008). Tendo em vista seu alto desempenho fermentativo, as linhagens PE-2 e CAT-1 estão sendo estudadas mais profundamente a fim de se compreender as características que as diferenciam em relação às demais em escala industrial. Argueso et al. (2009), ao observarem que os estoques comercialmente disponíveis da PE-2 apresentavam grande variedade de cariótipos, selecionaram e caracterizaram uma colônia única, denominada JAY270. Análises moleculares mostraram que o genoma de PE-2 é altamente heterozigoto (2

SNPs/kb), tanto estruturalmente quanto a nível de nucleotídeos, apresentando polimorfismos estruturais entre cromossomos homólogos. A alta capacidade de adaptação de PE-2 às condições estressantes impostas em uma dorna de fermentação está diretamente ligada a sua arquitetura genômica heterogênea, tornando tais cepas ideais para a criação de uma nova geração de organismos industriais, idealizados para as novas tecnologias de produção de etanol e outros processos biotecnológicos (Argueso & Pereira, 2010).

[6] Cofatores desempenham um papel essencial em um grande número de reações bioquímicas e na produção de diferentes compostos (Liu et al., 2006). Eles participam de uma série de funções fisiológicas, incluindo a regulação de metabolismo energético, ajuste do estado redox intracelular, controle do fluxo de carbono, atividade mitocondrial, regulação do ciclo celular e modulação da virulência. Em microrganismos, os cofatores NADH/NAD<sup>+</sup> e NADPH/NADP<sup>+</sup> estão envolvidos em 740 e 887 reações bioquímicas e interagem com 433 e 462 enzimas, respectivamente (Chen et al., 2014). O NAD<sup>+</sup> atua em oxidações, geralmente associadas a processos catabólicos, enquanto o NADPH é utilizado em reduções, geralmente associadas a processos anabólicos. As reações onde ocorre a incorporação de um íon hidreto pelo NAD<sup>+</sup> (ou NADP<sup>+</sup>) a partir de um substrato reduzido, ou NADPH (ou NADH) doa um íon hidreto para um substrato oxidado são conhecidas como oxirredutases, também denominadas desidrogenases (Nelson & Cox, 2011).

[7] A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup> em sua forma oxidada) e o seu análogo nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato (NADP<sup>+</sup>) são formados por dois nucleotídeos ligados por seus grupos fosfato por meio de uma ligação fosfoanidrido. Ambas as coenzimas sofrem redução reversível do anel nicotinamida. À medida que uma molécula de substrato

sofre oxidação (desidrogenação), liberando dois átomos de hidrogênio, a forma oxidada do nucleotídeo (NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>) recebe um íon hidreto (:H<sup>-</sup>, o equivalente a um próton e dois elétrons), sendo transformada na sua forma reduzida (NADH ou NADPH). O segundo próton removido do substrato é liberado no solvente aquoso (Nelson & Cox, 2011).

[8] Em *S. cerevisiae* há um aumento de complexidade em termos de balanço entre a formação e consumo de cofatores, já que não há atividade de uma transidrogenase que possa converter NADH diretamente em NADPH. Além disso, como o metabolismo é compartimentalizado, não havendo fluxo de cofatores entre mitocôndria e citosol, a formação e consumo dos cofatores NADH e NADPH deve ser balanceada em cada compartimento, o que impõe restrições no fluxo de carbono. Assim sendo, devem existir mecanismos distintos para re-oxidar os cofatores no citosol e mitocôndria (Santos et al., 2004; Vemuri et al., 2006).

[9] NADH é gerado primariamente no citosol pela glicólise e na mitocôndria pelo ciclo do ácido cíclico (TCA) (Vemuri et al., 2006). No citosol, a glicose é oxidada usando NAD<sup>+</sup> como cofator, o qual é simultaneamente convertido na sua forma reduzida, NADH, em quantidade equivalente. Sendo o NADH um cofator altamente utilizado em diversas reações metabólicas, qualquer alteração na taxa NADH/NAD<sup>+</sup> leva a grandes alterações no metabolismo. O balanço NADH/NAD<sup>+</sup> é um fator importante na manutenção do fluxo glicolítico. Assim sendo, a depleção de NAD<sup>+</sup> pode forçar o fluxo a cessar. A fim de aumentar a atividade glicolítica, o NADH produzido na glicólise, oxidação de ácidos graxos e o ciclo de ácido cítrico deve ser oxidado a NAD<sup>+</sup> para alcançar um equilíbrio redox (Liu et al., 2006).

[10] Existem, pelo menos, cinco mecanismos para reoxidação do NADH em *S. cerevisiae*: fermentação alcoólica; produção de glicerol; oxidação de NADH intramitocondrial via NADH

desidrogenase mitocondrial interna; e regeneração citosólica através de NADH desidrogenases mitocondriais externas ou via glicerol-3-fosfato, durante a respiração (Bakker et al., 2001).

[11] A regeneração de  $\text{NAD}^+$  a partir de NADH pela levedura pode ocorrer em aerobiose, na cadeia de transporte de elétrons, com oxigênio comoceptor final de elétrons e com a produção de grande quantidade de ATP. O NADH mitocondrial é oxidado por uma NADH desidrogenase mitocondrial interna ligada a membrana e codificada pelo gene *ND11*. Ou pode acontecer sob condições anaeróbicas, na fermentação alcoólica, primariamente com o acetaldeído comoceptor de elétrons, em uma reação onde a álcool desidrogenase catalisa a oxidação da NADH a  $\text{NAD}^+$ , com a produção de etanol e dióxido de carbono a partir de piruvato. O NADH citosólico é oxidado por duas NADH desidrogenases mitocondriais externas (citosólicas) ligadas a membrana, codificadas pelos genes *NDE1* e *NDE2* com sítios catalíticos em contato com o citosol. Adicionalmente, glicerol-3-fosfato desidrogenases (codificadas por *GPD1* e *GPD2*) oxidam o NADH citosólico com concomitante formação de glicerol. Sob condições anaeróbicas, o NADH originado da produção de ácidos orgânicos, biomassa, entre outros, é re-oxidado a  $\text{NAD}^+$  pela formação de glicerol, já que a respiração não é possível e a formação de etanol é um processo redox-neutro (Bro et al., 2006; Liu et al., 2006; Vemuri et al., 2006).

[12] Em *S. cerevisiae*, NADPH pode ser gerado, principalmente, nas reações catalisadas por duas desidrogenases na fase oxidativa das pentoses fosfato (*ZWF1*, glicose-6-P desidrogenase e *GND1*, 6-fosfogluconato desidrogenase), na reação catalisada pela isocitrato desidrogenase NADP+ dependente (*IDP2*), na reação catalisada pela acetaldeído desidrogenase NADP+ dependente (*ALD6*) e na reação catalisada pela enzima málica (*MAE1*). De todas citadas

acima, a via das pentoses fosfato representa a principal via de produção de NADPH na levedura (Santos et al., 2004; Wang et al., 2013).

[13] A via das pentoses fosfato é controlada principalmente em nível enzimático, com NADPH e ATP inibindo competitivamente a glicose-6-P desidrogenase (*ZWF1*) e 6-fosfogluconato desidrogenase (*GND1*). A regulação coordenada dos genes envolvidos com o metabolismo de NADPH, incluindo a maioria dos genes da PPP, foi reportado sob condições de stress oxidativo. A ativação de genes dependentes de NADPH envolve *STB5*, responsável também por reprimir a expressão de *PGI*, que codifica a fosfoglicose isomerase na junção entre a via glicolítica e a da pentose fosfato. Esse fator de transcrição desempenha um papel fundamental no redirecionamento do fluxo de carbono para fornecer NADPH adicional em resposta a estresse oxidativo, por exemplo, além de ser responsável por manter o fluxo basal da PPP sob condições anaeróbicas (Celton et al., 2012b).

[14] Celton (2012) demonstrou que células de levedura respondem ao aumento da demanda de NADPH com o aumento do fluxo através das vias da pentose fosfato e de formação de acetato, o que corresponde a 80 e 20% da demanda de NADPH, respectivamente. Alguns genes da pentose fosfato são regulados positivamente com o aumento da demanda por NADPH. *GND1* e *SOL3* são induzidos quando uma concentração moderada de NADPH é necessária pela adição de acetoina. Quando essa demanda aumenta, dois genes da fase não oxidativa da pentose fosfato, *TAL1* e *TKL1* também são regulados positivamente (Celton et al., 2012a).

[15] O balanço redox ocorre quando a produção e o consumo de cofatores são aproximadamente iguais. Desbalancear o potencial oxi-redutivo pode causar prejuízos a célula, gasto de energia e carbono e prejudicar todo o metabolismo celular. A quantidade e disponibilidade de cofatores na célula pode

se tornar um passo limitante, sendo essenciais em diversas reações metabólicas e na produção de diferentes compostos. Assim sendo, manipulações no balanço redox e na quantidade de cofatores produzidos pela célula pode ser uma poderosa ferramenta no melhoramento da performance fermentativa da levedura (Liu et al., 2006; Chen et al., 2014). O balanço redox pode ser regulado por diferentes abordagens, como regulação da via metabólica pelo ajuste da expressão dos genes, engenharia de proteínas envolvendo sítio de ligação aos cofatores, reestruturação do genoma pela remoção de genes redundantes que utilizam cofatores, regeneração de coenzimas pela reestruturação das rotas metabólicas, entre outros (Chen et al., 2014).

[16] Além das alternativas descritas acima, um método passível de gerar avanços na produção de etanol por *S. cerevisiae* e que não envolve manipulação genética direta é a aplicação de uma corrente elétrica para estimular o metabolismo da levedura em fermentadores modificados com eletrodos, denominados reatores bioelétricos (Thrash and Coates, 2008). Nesse reator modificado, microrganismos são cultivados em uma câmara contendo um eletrodo que recebe a corrente elétrica de um circuito acoplado a uma fonte, transferindo elétrons às células. Os elétrons recebidos pelas células podem, então, ser utilizados em reações do metabolismo envolvendo redução de substratos, fornecendo poder redutor às células, diminuindo a geração de subprodutos e conseqüentemente aumentando a produção de etanol.

[17] O etanol de segunda geração ou etanol celulósico consiste na conversão de polímeros que formam a parede celular vegetal em etanol. Estes polímeros constituem a celulose, hemicelulose e lignina, e sua hidrólise disponibiliza açúcares fermentescíveis, representados por hexoses e pentoses, que podem ser convertidos a etanol por *S. cerevisiae*. Hexoses são normalmente utilizadas por *S.*

cerevisiae. Porém, linhagens selvagens dessas leveduras não conseguem metabolizar as pentoses xilose e arabinose presentes na biomassa. Tendo em vista sua significativa parcela na constituição da biomassa, a completa utilização desses compostos aumentaria o rendimento e a viabilização do processo de produção de etanol de segunda geração.

[18] A engenharia metabólica de leveduras para introdução das vias metabólicas de consumo de xilose tem como foco duas vias principais: a via Xilose Redutase - Xilitol Desidrogenase (XR-XDH) e a via Xilose Isomerase (XI). A via XR-XDH, presente em micro-organismos eucariotos, consiste em duas reações de oxi-redução, onde a xilose é reduzida a xilitol pela ação da enzima xilose redutase (XR), em uma reação mediada por NADPH/NADH e em seguida, o xilitol é oxidado a xilulose por meio da enzima xilitol desidrogenase (XDH), mediada exclusivamente por NAD<sup>+</sup>. A diferença de especificidade pelos cofatores gera o desbalanço redox. Para gerar NADPH para a reação da xilose redutase, parte do carbono da xilose deve ser direcionado através da fase oxidativa da pentoses fosfato, envolvendo as reações de glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato. Apesar de permitir uma eficiente regeneração de NADPH, ocorre perda de carbono na forma de CO<sub>2</sub> o que impacta o rendimento de etanol a partir de xilose (van Maris et al., 2007).

[19] Em aerobiose, o NAD<sup>+</sup> é regenerado na cadeia respiratória, com o oxigênio como aceptor final de elétrons. Sob limitadas concentrações de oxigênio, a reoxidação do excesso de NADH, gerado através da reação da xilitol desidrogenase, é realizada através de compostos mais reduzidos que a xilose, como xilitol e glicerol, subprodutos da fermentação. A produção do xilitol ocorre via xilose redutase, que devido a dupla especificidade pela coenzima, pode usar também NADH. Como esse mecanismo envolve o consumo de uma xilose para cada NADH gerado, tem um alto impacto

negativo no rendimento de etanol obtido a partir de xilose (Hahn-Hägerdal et al., 2001; Aguiar et al., 2002; Kuyper et al., 2004; van Maris et al., 2007).

[20] Apesar de *S. cerevisiae* possuir os genes que codificam uma aldose redutase dependente da NADH (*GRE3*) e uma xilitol desidrogenase (*Xyl2*), eles não permitem seu crescimento eficiente em xilose. A superexpressão desses genes usando promotores endógenos permitiu o crescimento em shakers, com taxa de crescimento de 0.01 h<sup>-1</sup> em D-xilose e rendimento de xilitol de 55%. Sob condições anaeróbicas, essas linhagens foram incapazes de crescer (van Maris et al., 2007).

[21] A XR e XDH mais comumente usada em estudos envolvendo a via oxi-redutiva de conversão de xilose pertence a levedura *Scheffersomyces stipitis*. Devido a preferência da XR de *S. stipitis* por NADPH, enquanto que a XDH produz apenas NADH, o acúmulo de xilitol resultante e o baixo rendimento de etanol tem sido atribuído a esse desbalanço de cofatores. Diversos estudos focaram em estratégias para resolver esse problema. Sítios de ligação aos cofatores em xiloses redutases são alvo de técnicas de engenharia de proteínas, visando aumentar a afinidade por NADH em relação a NADPH. Porém, o aumento da taxa de NADH/NADPH nesses estudos se deve a uma diminuição na eficiência catalítica de ligação ao NADPH pela XR, enquanto que o real aumento na afinidade de ligação ao NADH é bem baixo (Liang et al., 2007; Watanabe et al., 2007; Bengtsson et al., 2009; Runquist et al., 2010; Cai et al., 2012).

[22] Em uma abordagem similar, Watanabe (2005) alterou completamente a afinidade da enzima xilitol desidrogenase de *S. stipitis* de NAD<sup>+</sup> para NADP<sup>+</sup> através de mutagênese sítio dirigida. As enzimas com duplas mutações (D207A/I208R e D207A/F209S) tiveram aumento na afinidade por NADP<sup>+</sup>, mas a preferência por NAD<sup>+</sup> ainda se mantinha superior. As enzimas com mutações triplas (D207A/I208R/F209S) e quádruplas

(D207A/I208R/F209S/N211R) mostraram valores maiores que 4500 vezes em  $k_{cat}/K_m$  com NADP<sup>+</sup> em relação a enzima selvagem, atingindo valores comparáveis ao  $k_{cat}/K_m$  com NAD<sup>+</sup> em relação a enzima selvagem. Em estudo posterior, a enzima com a tripla mutação foi introduzida em uma linhagem de *S. cerevisiae*, substituindo a XDH selvagem de *S. stipitis*. A linhagem Y-ARSdR produziu 86% menos xilitol e conseqüentemente 41% mais etanol em relação a linhagem parental (Watanabe et al., 2007). A linhagem MA-N5 com a XDH mutante NADP<sup>+</sup> dependente apresentou alto rendimento de 0.49 g/g a partir dos açúcares totais presentes hidrolisado lignocelulósico (Matsushika et al., 2009). Com a finalidade de melhorar o balanço de cofatores nessas linhagens, Khattab (2013) utilizou estratégias de mutagênese sítio dirigida para produzir uma série de XR que utilizam unicamente NADPH, que ao ser oxidado, fornece NADP<sup>+</sup> para a XDH NADP<sup>+</sup> dependente. As linhagens resultantes apresentaram redução de xilitol de 34.4 a 54.7% em relação a linhagem controle, além de aumentos de 10 e 20% na produção de etanol em duas das linhagens construídas com as novas xiloses redutases.

[23] Diferente das abordagens descritas acima, que modificam racional ou aleatoriamente as enzimas da via de conversão de xilose, outras estratégias foram descritas na literatura onde ocorre alteração nas vias centrais de consumo de açúcares visando alteração e ajuste no balanço de cofatores. A diminuição da produção de NADPH pela inativação dos genes da fase oxidativa da via das pentoses fosfato, *GND1*, que codifica a 6-fosfogluconato desidrogenase ou *ZWF1*, que codifica a glicose 6-fosfato desidrogenase, resultou em linhagens com redução na produção de xilitol e aumento do rendimento de etanol obtido a partir de xilose. Porém, tais linhagens tiveram uma diminuição significativa na velocidade de consumo de xilose, explicado pela redução desse açúcar estar acontecendo mediada principalmente através de NADH,

pela ação da enzima xilose redutase (XR), com especificidade por ambos os cofatores. Outro fato observado foi o aumento da quantidade de acetato produzido, o que sugere que a produção de acetato a partir de acetaldeído se tornou a nova fonte de fornecimento de NADPH para a XR (Jeppsson et al., 2002; Cai et al., 2012).

[24] Para facilitar a regeneração de NADPH, a expressão de uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Kluyveromyces lactis* NADP<sup>+</sup> dependente (GDP), associada com a deleção de ZWF1 resultou em uma linhagem com maior rendimento de etanol a partir de xilose. A regeneração de NADPH através desse gene não está associada a produção de CO<sub>2</sub>, como acontece na via das pentoses fosfato, justificando a melhor performance em relação a linhagem que não possui o GDP expresso. Tal abordagem permite a criação de um sistema de regeneração de cofatores não ligado a perda de carbono através da produção de CO<sub>2</sub>, o que resulta em maior quantidade de etanol produzido (Verho et al., 2003).

[25] Outra estratégia visando a introdução de uma via alternativa de re-oxidação de NADH foi através da introdução da rota alternativa da fosfocetolase, comumente encontrada em procariotos. A expressão heteróloga da fosfotransacetilase de *Bacillus subtilis* e da acetaldeído desidrogenase de *Entamoeba histolytica* visa um desvio na via das pentoses fosfato, pela conversão de xilulose-5-P em gliceraldeído-3-P, que entra na via glicolítica, e acetil-P, que pode ser convertido pela fosfotransacetilase em acetil-CoA, o que é reduzido a acetaldeído pela acetaldeído desidrogenase, com a utilização de NADH como cofator. A introdução desses genes em *S. cerevisiae* resultou em uma linhagem com aumento de 25% na produção de etanol, devido a uma menor formação do subproduto xilitol (Sonderegger et al., 2004).

[26] Apesar dos esforços em estratégias para regular e ajustar o balanço redox em linhagens contendo a via oxirredutiva de conversão de xilose, outras razões desconhecidas, além do desbalanço redox, são responsáveis pela alta quantidade de xilitol produzindo e baixa produtividade de etanol em condições anaeróbicas de consumo de xilose. Outros esforços como o desenvolvimento de uma rede metabólica e regulatória, levando em conta todo o metabolismo redox da célula deve ser considerado para resolver esse problema (Cai et al., 2012).

[27] **Xiong, M. et al.** \_O documento refere-se à alteração da xylose reductase para aumentar a produção de etanol em *Saccharomyces cerevisiae*, mais especificamente na alteração da XR para ter maior afinidade por NADH ao invés de NADPH.

[28] **Khathaab, S.M.R. et al.** O documento refere-se à produção de bioetanol usando combinações de *Saccharomyces cerevisiae*, Xilose redutase e Xilitol desidrogenase, mais especificamente na alteração sítio específica da XR para ter afinidade apenas por NADPH.

[29] O documento US20130040353 refere-se à produção de etanol no meio de *Saccharomyces cerevisiae* e a alteração da XR para ter maior afinidade por NADH ao invés de NADPH.

[30] A presente invenção difere dos documentos apresentados acima, pois não faz alteração da sequência de XR. Foi utilizado uma XR que naturalmente já tem maior afinidade por NADH ao invés de NADPH, diminuindo o desbalanço redox e aumentando a produção de etanol.

[31] O documento americano US20120329104 refere-se à combinação de microorganismos para a produção de etanol e descreve a criação de uma linhagem utilizando a via oxirredutiva de *S. stipitis*. Não foi utilizado nenhuma estratégia para regular o balanço redox da linhagem. Na presente invenção foi utilizada em uma linhagem industrial, mais tolerante a inibidores presentes no processo 2G e com

características de interesse industrial. Além disso, foram empregadas diversas estratégias para regular o balanço redox da linhagem e melhorar a produção de etanol. Os cassetes utilizados também apresentam diferenças em relação ao promotor e terminador, região de inserção e marcador utilizado.

[32] Diante do exposto, seria útil se a técnica dispusesse de cassete de expressão e leveduras capazes de regular o balanço redox de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*, amplamente utilizada no setor de etanol 2G, contendo a via oxi-redutiva de consumo de xilose.

#### BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[33] A presente invenção refere-se a levedura industrial geneticamente modificada LVY127 com a via oxi-redutiva de conversão de xilose, cassetes de expressão gênica, processo de obtenção de etanol 2G e uso da levedura LVY127.

[34] O cassete de expressão gênica 1 compreende:

- a xilose redutase (XR) de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica 3-fosfoglicerato Quinase (PGK1) em *S. cerevisiae*;
- o gene *URA3* de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação;
- gene xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase, isoenzima 1 (TDH1) em *S. cerevisiae*, clonados no vetor pRS304; e
- sequência de nucleotídeos é representada pela **SEQ ID NO:1**.

[35] O cassete de expressão gênica 2 compreende:

- promotor (*ADH1*) e terminador (*ADH1*) do gene que codifica a enzima xiluloquinase em *S. cerevisiae*;
- gene *URA3* de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação; e

- sequência de nucleotídeos representada pela **SEQ ID NO:2**.
- [36] O cassete de expressão gênica 3 compreende:
- gene xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase, isoenzima 1 (*TDH1*) em *S. cerevisiae*;
  - gene *URA3* de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação; e
  - sequência de nucleotídeos é representada pela **SEQ ID NO:3**.
- [37] A levedura geneticamente modificada é a *Saccharomyces cerevisiae* **DSM32120**.
- [38] O processo de obtenção de etanol 2G é realizado com a levedura geneticamente modificada é a *Saccharomyces cerevisiae* **DSM32120**.
- [39] A levedura **LVY127 (DSM32120)** possui aplicação em qualquer processo que envolva o consumo de xilose.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

- [40] A Figura 1 representa o fluxograma do desenvolvimento da linhagem **LVY127 (DSM32120)**.
- [41] A Figura 2 representa o gráfico que demonstra o consumo de xilose pela linhagem **LVY127 (DSM32120)** comparada com a linhagem selvagem derivada de PE-2.
- [42] A Figura 3 representa o gráfico de desempenho fermentativo global da linhagem **LVY127 (DSM32120)** em meio contendo uma mistura de glicose e xilose como fontes de carbono. Os açúcares e principais produtos da fermentação estão discriminados na legenda.
- [43] A Figura 4 representa o gráfico que demonstra a via metabólica representando o consumo de açúcares pela linhagem **LVY127 (DSM32120)**, contendo as XR e XDH de *S. stipitis*.
- [44] A Figura 5 representa o esquema representativo do plasmídeo **pSsXRDXH**, contendo as XR e XDH de *S. stipitis*. O esquema foi construído utilizando o software SnapGene

Viewer. O fragmento contendo os genes XR e XDH de *S. stipitis* foi amplificado do vetor pSsXRXDH e utilizado para a transformação de *S. cerevisiae*.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[45] A presente invenção refere-se a levedura industrial geneticamente modificada LVY127 com a via oxi-redutiva de conversão de xilose, cassetes de expressão gênica, processo de obtenção de etanol 2G e uso da levedura LVY127.

[46] O cassete de expressão gênica 1 compreende:

- a xilose redutase (XR) de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica 3-fosfoglicerato Quinase (PGK1) em *S. cerevisiae*;
- o gene URA3 de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação;
- gene xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase, isoenzima 1 (TDH1) em *S. cerevisiae*, clonados no vetor pRS304; e
- sequência de nucleotídeos é representada pela **SEQ ID NO:1**.

[47] O cassete 1 é flanqueado por regiões que apresentam homologia a 516pb do centrômero cinco de *S. cerevisiae*.

[48] O cassete de expressão gênica 2 compreende:

- promotor (ADH1) e terminador (ADH1) do gene que codifica a enzima xiluloquinase de *S. cerevisiae*;
- gene URA3 de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação; e
- sequência de nucleotídeos é representada pela **SEQ ID NO:2**.

[49] Para a construção do micro-organismo DSM 32120 a primeira inserção do cassete 2 ocorreu a 288 pb do centrômero dois e a segunda cópia está a 228 pb do centrômero oito.

[50] O cassete de expressão gênica 3 compreende:

- gene xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase, isoenzima 1 (*TDH1*) em *S. cerevisiae*;

- gene *URA3* de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação; e

- sequência de nucleotídeos é representada pela **SEQ ID NO:3**.

[51] O cassete 3 refere-se à segunda cópia do gene que codifica a xilitol desidrogenase inserido a 454 pb do centrômero três.

[52] A levedura geneticamente modificada é a *Saccharomyces cerevisiae* **DSM32120**.

[53] As etapas da construção da LVY127 (**DSM32120**) envolveram a inserção de 1 cópia do gene que codifica a xilose redutase (XR) de *S. stipitis*, 2 cópias do gene que codifica a xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis*, deleção da aldose redutase *GRE3* e inserção de 2 cópias de *XKS1* (Figura 1).

[54] Para construção da linhagem LVY127 (**DSM32120**) fermentadora de xilose, foi utilizado um esporo da linhagem industrial PE-2, amplamente utilizada na indústria de etanol de primeira geração. A linhagem PE-2 apresenta alta performance fermentativa e é altamente tolerante a diversos estresses do processo industrial, se tornando uma plataforma robusta para a introdução da via de conversão de xilose.

[55] Os genes que expressam as enzimas XR e XDH de *S. stipitis* foram clonados, respectivamente, sob a ação dos promotores *PGK1* e *TDH1*, e inseridos a 516 pb do centrômero cinco, resultando na linhagem LVY103. A linhagem era capaz de consumir toda a xilose presente em meio de cultivo, produzindo etanol. Porém, utilizando apenas essas modificações, a maior parte da xilose foi convertida em xilitol. A superexpressão do gene *XKS1* sob ação do promotor *ADH1* deu origem a linhagem LVY123 e permitiu uma melhora

significativa de desempenho, alcançando rendimento de etanol de 34% a partir dos açúcares totais (sendo 51% o rendimento teórico), e rendimento de xilitol de 19% e glicerol de 5,51%. O cassete contendo o gene *XKS1* foi inserido próximo ao centrômero dois.

[56] Por apresentar um rendimento ainda distante do teórico, o próximo passo desenvolvido foi o aumento do fluxo xilose à xilulose-5-P, com a duplicação do número de cópias integradas dos genes *XDH* e *XKS1* (inseridos próximo aos centrômeros três e oito, respectivamente), além da deleção do gene que codifica uma aldose redutase, *GRE3*. Esse gene tem a mesma função que a xilose redutase (XR), realizando a redução da xilose a xilitol, utilizando exclusivamente NADPH como cofator. O gene XR de *S. stipitís* utilizado na transformação utiliza tanto NADPH como NADH, embora tenha uma maior afinidade pelo primeiro. A deleção do *GRE3* é uma estratégia descrita que visa a diminuição de xilitol, visto que sua produção seria exclusivamente via XR de *S. stipitís*, o qual realiza a oxidação de NADH a NAD<sup>+</sup> permitindo o aumento do fluxo pela *XDH* NAD<sup>+</sup> dependente, próximo gene da via. A deleção do gene *GRE3* (LVY124) e o aumento do número de cópias do *XDH* (LVY125) e *XKS1* resultou na linhagem LVY127, objeto da presente invenção, que apresentou rendimento de etanol de 36% e diminuição nos rendimentos dos subprodutos xilitol e glicerol, com 8% e 8%, respectivamente.

#### Exemplo de concretização

##### **Linhagens utilizadas**

[57] Para os experimentos de clonagem e multiplicação dos plasmídeos foi utilizada a linhagem bacteriana de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Stratagene®). Quando necessário, a linhagem foi ativada à 37 °C por esgotamento em meio de cultura LB (Luria-Bertaini). Para a construção das linhagens foi utilizada a cepa industrial de *S. cerevisiae* PE-2, mantida em meio YEPD.

### ***Construção do cassete de expressão***

[58] Para a construção dos cassetes foi utilizada a técnica descrita por Gibson et al. (2009), que consiste na fusão de fragmentos de DNA com um mix das enzimas T5 exonuclease, Taq ligase e DNA polimerase em uma única reação. Para o processo de seleção, foi utilizado o sistema Cre/loxP (Gueldener et al., 2002). O gene *URA3* foi amplificado por PCR, juntamente ao seu promotor e terminador, e foram adicionadas sequências *loxP* na mesma orientação, nas duas extremidades, permitindo que esse marcador seja utilizado em os cassetes de transformação. Sequências de homologia ao local de inserção foram adicionadas nas extremidades dos cassetes.

### ***Transformação de levedura e processo de seleção***

[59] A transformação de levedura for feita utilizando o método de acetato de lítio descrito por Gietz e Schiestl (2007). A linhagem utilizada para a transformação é um esporo haplóide mat  $\alpha$  derivado do diplóide *S. cerevisiae* PE-2. Para iniciar as introduções dos cassetes, a linhagem teve o gene *URA3* removido para ser utilizado como marca auxotrófica. Os transformantes foram selecionados em meio YNB (sem uracila). A retirada do marcador pode então ser realizada com o plasmídeo pSH65 (Gueldener et al., 2002), que contém o gene que codifica a recombinase Cre sob a ação do promotor induzível por galactose.

### ***Ensaio fermentativo***

#### ***Cultivo em erlenmeyer***

[60] O ensaio fermentativo foi realizado em meio YPDx (20 g/L de glicose e 50 g/L de xilose) em erlenmeyers de 125 ml e volume de trabalho de 80 ml, iniciando a cultura com OD de aproximadamente 1,0. A temperatura e velocidade de agitação foram mantidas constantes, respectivamente, em 30 °C e 80 rpm. Amostras foram retiradas para medir OD e para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

#### ***Cultivo em biorreator***

[61] O ensaio fermentativo foi realizado em meio YPDX (20 g/L de glicose e 50 g/L de xilose) em biorreatores de 2,5 L de volume útil, Labfors (Infors HT). O volume de trabalho utilizado foi de 1 L, com pH mantido constante durante o crescimento celular em 5,5 pela adição de solução aquosa de NaOH 6 mols/L, iniciando a cultura com OD de aproximadamente 1,0. A temperatura e velocidade de agitação foram mantidas constantes em 30 °C e 150 rpm respectivamente. Para garantir o estado de anaerobiose, antes da inoculação, o meio de cultivo e a atmosfera do biorreator foram saturados com fluxo de nitrogênio gasoso de 3 LN/min (litros normais por minuto) durante 10 minutos. Amostras eram retiradas para medir OD e para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

#### **Quantificação dos produtos da fermentação**

[62] A quantificação de glicose, xilose, xilitol, glicérol, ácido acético e etanol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando o cromatógrafo Alliance HT (Waters) com detector de índice de refração (Waters 2414). As amostras foram analisadas por HPLC-RI utilizando a coluna de exclusão iônica HPX-87H (300mm x 7,8mm, BioRad®), aquecida em forno a 35 °C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mM (pH 2,3) como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. Uma curva padrão com as concentrações conhecidas com compostos de interesse também foram analisadas pelo mesmo procedimento. As concentrações dos compostos nas amostras foram determinadas por comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidos com as curvas de calibração. O crescimento da linhagem LUY127, modificada com as vias de conversão de xilose, objeto da presente invenção, foi comparado com a linhagem selvagem PE-2, identificada na figura 2 como WT ("wild-type"). O ensaio fermentativo foi conduzido em meio contendo uma mistura de glicose e xilose nas concentrações de 10 e 30 g/L, respectivamente. A figura

2 demonstra que a linhagem LVY127 agora é capaz de consumir toda a xilose presente no meio, enquanto que a linhagem selvagem não foi capaz de consumir esse açúcar. O experimento foi conduzido em triplicata. A levedura LVY127 (**DSM32120**) possui aplicação em qualquer processo que envolva o consumo de xilose.

[63] A performance fermentativa da linhagem LVY127 (**DSM32120**) foi avaliada em condições semi-anaeróbicas em meio contendo xilose e glicose como fontes de carbono, iniciando com baixo volume de células com  $OD_{600nm}$  de aproximadamente 1.0 (0.25 g DW/L). A linhagem apresentou um rendimento de etanol de 36%, além de uma diminuição nos rendimentos dos subprodutos xilitol e glicerol em relação as linhagens predecessoras, com 8% e 8%, respectivamente.

REIVINDICAÇÕES

1. Cassete de expressão gênica 1 **caracterizado por** compreender:

- xilose redutase(XR) de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica 3-fosfoglicerato Quinase (PGK1) em *S. cerevisiae*;

- gene *URA3* de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação;

- gene xilitol desidrogenase de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase, isoenzima 1 (TDH1) em *S. cerevisiae*, clonados no vetor pRS304; e

- sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO:1.

2. Cassete de expressão gênica 2 **caracterizado por** compreender:

- promotor (*ADH1*) e terminador (*ADH1*) do gene que codifica a enzima xiluloquinase em *S. cerevisiae*;

- gene *URA3* de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação; e

- sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO:2.

3. Cassete de expressão gênica 3 **caracterizado por** compreender:

- gene xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis* sob a ação do promotor e terminador do gene que codifica a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase, isoenzima 1 (TDH1) em *S. cerevisiae*;

- gene *URA3* de *S. cerevisiae*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado por dois sítios loxP em cada extremidade e na mesma orientação; e

- sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO:3.

4. Levedura geneticamente modificada **caracterizada por ser** *Saccharomyces cerevisiae* DSM32120.

5. Levedura, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada por** ser construída com a inserção de 1 cópia do gene que codifica a xilose redutase (XR) de *S. stipitis*, 2 cópias do gene que codifica a xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis*, deleção da aldose redutase *GRE3* e inserção de 2 cópias de *XKS1*.

6. Processo de obtenção de etanol 2G **caracterizado por** ser realizado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* DSM32120.

7. Uso da levedura conforme descrita nas reivindicações 4 e 5 **caracterizado por** ser para aplicação em qualquer processo que envolva o consumo de xilose.

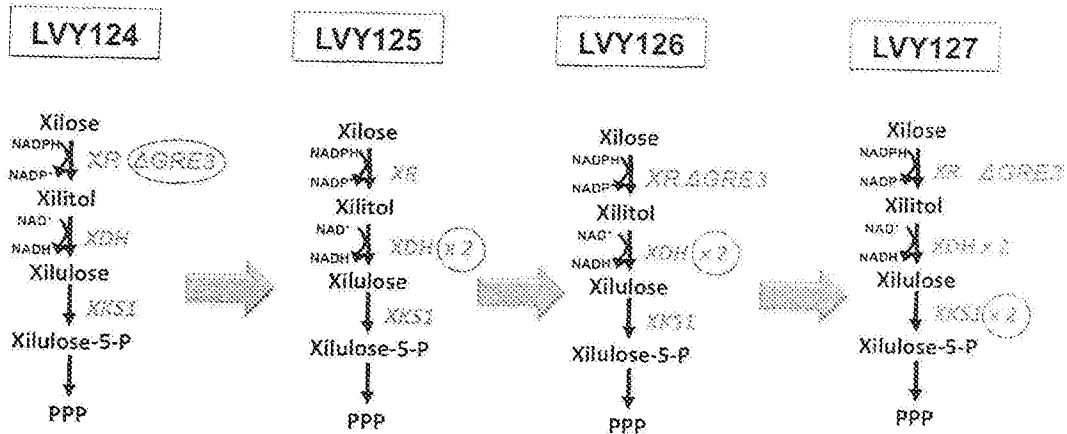


Figura 1

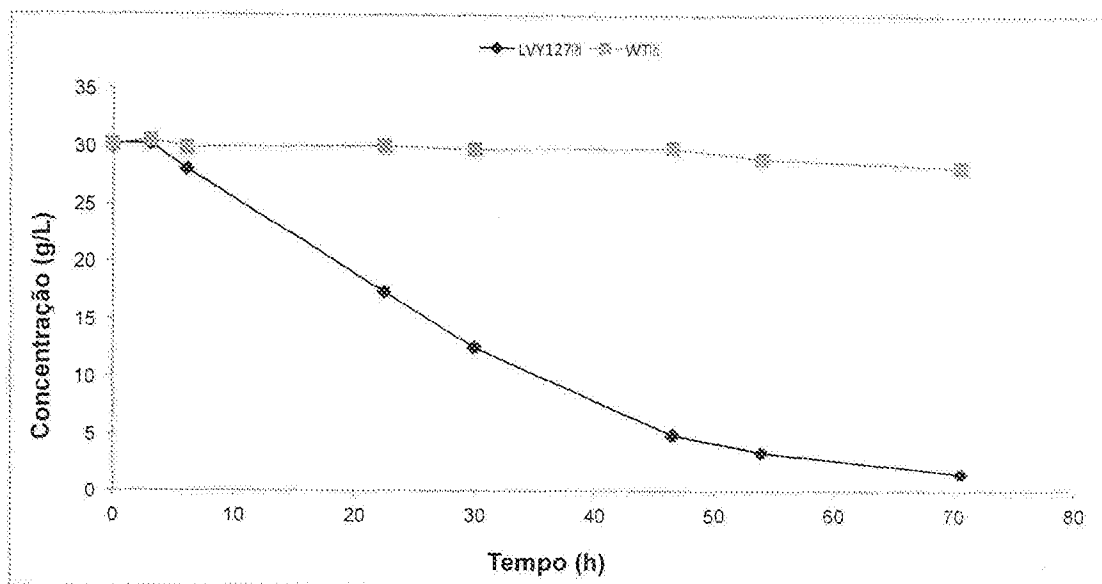


Figura 2

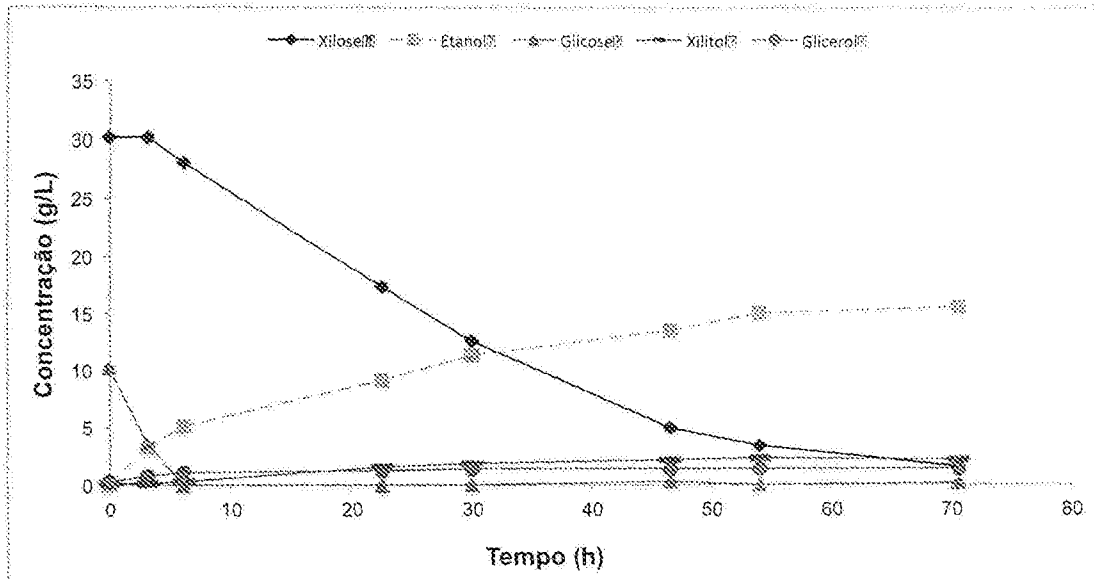


Figura 3

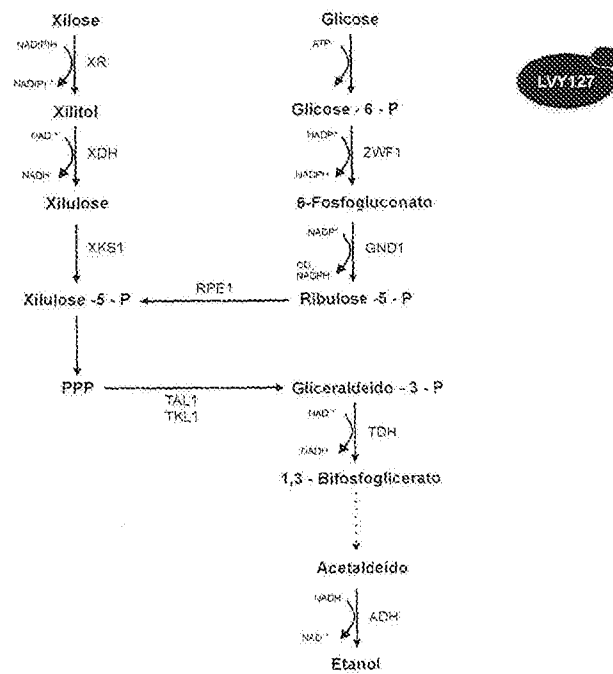


Figura 4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2017/000064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <b>C12N 15/53 (2006.01), C12N 15/81 (2006.01), C12N 1/19 (2006.01), C12N 1/22 (2006.01), C12P 7/10 (2006.01), C12R 1/85 (2006.01), C12R 1/865 (2006.01)</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C12P</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <b>Google, Base de patentes do INPI-BR (SINPI), Plataforma Lattes (<a href="http://lattes.cnpq.br/">http://lattes.cnpq.br/</a>)</b>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>GENESEQ, USGENE, WOGENE, GenBank, EPODOC</b> (see supplemental sheet)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<b>KARHUMAA, K. <i>et al.</i> Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using metabolic engineering. Yeast. 2005. Vol. 22, No. 5, pages : 359-68. doi: 10.1002/yea.1216.</b> Abstract, Table 1, first paragraph of the "Results" section, first column of page 362, first paragraph of page 364.	1 to 7
X Y	<b>BR 102014027984 A2 (BIOCELERE AGROINDUSTRIAL LTDA [BR])</b> 07 June 2016 (07.06.2016) Abstract, paragraphs [0051], [0059], [0064], [0080], [0082], Table 1, SEQ ID n°s 4 e 9.	2 1, 3 to 7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search <b>22 August 2017 (22.08.2017)</b>	Date of mailing of the international search report <b>01 September 2017 (01.09.2017)</b>	
Name and mailing address of the ISA/ <b>INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Sao Bento n° 1, 17° andar cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ</b>	Authorized officer <b>Flávia Riso Rocha</b>	
Facsimile No.	Telephone No. <b>+55 21 3037-3493/3742</b>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2017/000064

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELIASSON, A. <i>et al.</i> Anaerobic xylose fermentation by recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. Appl Environ Microbiol. 2000. Vol. 66, no. 8, pages : 3381- 3386. PMID: PMC92159. Abstract, "Materials and Methods" section, Figure 1, lines 2 to 6 of the second column on page 3381.	1 to 7
X	KARHUMAA, K. <i>et al.</i> Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Microb Cell Fact. 2007. Vol. 6:5. doi: 10.1186/1475-2859-6-5. Abstract, second column of page 2 Tables 1 to 4 Figures 3 and 4.	1 to 7
Y	HAHN-HAGERDAL, B. <i>et al.</i> Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. Appl Microbiol Biotechnol. 2007. Vol. 74, No. 5, pages : 937-53. doi: 10.1007/s00253-006-0827-2. Abstract, first complete paragraph of the second column of page 942, lines 4 to 7 of page 948, Tables 2 and 3.	1 to 3
X		4 to 7
X	BR 102014014407 A2 (BIOCELERE AGROINDUSTRIAL LTDA [BR]) 19 April 2016 (19.04.2016) Abstract, paragraphs [0011], [0023], [0025], [0027], [0077], Table 1 SEQ ID n°s 4, 9.	2
Y		1, 3 to 7
Y	US 2012329104 A1 ( SAMSUNG ELECTRONICS CO LTD [KR]) 27 December 2012 (27.12.2012) Cited in the description. Abstract, paragraphs [0044], [0046], [0048], [0060] to [0063], [0066], Example 2, set of claims, Figure 2.	1 to 7
Y	US 2009246857 A1 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION [US] ) 01 October 2009 (01.10.2009) Abstract, paragraphs [0045] to [0054], set of claims.	1 to 7
Y	JOHANSSON, B. & HAHN-HAGERDAL, B. Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Yeast. 2002. Vol. 19, No. 3, pages :225-231. doi: 10.1002/yea.833. Abstract, "Materials and Methods" section, "Discussion" section, first paragraph of the "Introduction" section, Figure 1.	1 to 3
A		4 to 7
Y	GUELDENER, U. <i>et al.</i> A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30, N°6:e23. PMID: 11884642. Abstract, Figure 1.	1 to 3
A		4 to 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2017/000064

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	<p>US 5866382 A (XYROFIN OY [FI]) 02 February 1999 (02.02.1999) Abstract, third paragraph of column 3, examples, set of claims, Figures 5 and 8.</p> <p>-----</p>	<p>1, 3 to 7 2</p>
A Y	<p>TRAFF, K. L. <i>et al.</i> Deletion of the GRE3 aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressing the xylA and XKS1 genes. Appl Environ Microbiol. 2001. Vol. 67, pages : 5668-5674. Abstract, sections "Materials and Methods" and "Discussion".</p> <p>-----</p>	<p>1 and 3 2, 4 to 7</p>

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The present international application does not relate to a single invention or to a group of inventions so linked as to form a single inventive concept, and thus contravenes PCT Rule 13.

The claimed subject matter can be grouped into four inventions:

- 1) a gene expression cassette (SEQ ID No. 1) comprising, inter alia, a sequence coding for xylose reductase (XR) of *S. stipitis* and for xylitol dehydrogenase (XDH) of *S. stipitis*, besides the gene URA3 (claim 1);
- 2) a gene expression cassette (SEQ ID No. 2) comprising, inter alia, a sequence coding for xylulokinase (XKS) of *S. cerevisiae* and the gene URA3 (claim 2);
- 3) a gene expression cassette (SEQ ID No. 3) comprising, inter alia, a sequence coding for XDH of *S. stipitis* and the gene URA3 (claim 3); (see supplemental sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

4) a genetically modified yeast, DSM32120, a method for producing ethanol 2G using this yeast, and the use thereof in any method involving xylose consumption (claims 4-7).

The reason why the above-mentioned inventions are not considered to be linked so as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13) are discussed hereinafter.

The expression cassettes defined in claims 1, 2 and 3 have different constructions. The yeast DSM32120 (LVY127) was in turn obtained by the transformation, using the claimed constructions, of the *S. cerevisiae* PE-2 line from which the gene GRE3 was deleted (paragraphs [53], [59] and figure 1). The only element shared by the claimed expression cassettes is the presence of the marker gene URA3, together with its promoter and terminator flanked by the loxP loci. However, this feature is not a special technical feature since the use of such a construction is common in the prior art for selecting colonies after transformation (using the gene URA3 as the marker), as well as the use of the same selection marker for multiple gene insertions, as illustrated in the article by Johansson, B. & Hahn-Hagerdal, B. (Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2002. Vol. 19, No. 3, pages: 225-231. doi: 10.1002/yea.833: abstract, section "Materials and Methods", section "Discussion", first paragraph of section "Introduction", figure 1).

Although it is taught in the description that the expression cassettes defined by claims 1-3 were used to generate the DSM32120 line, which is the subject matter of claims 4 and 5, it would also be possible to use these expression cassettes separately for other purposes (generating other yeast lines, for example). Consequently, it is not possible to determine a single special technical feature linking the above-mentioned inventions, that is to say, a common technical feature that defines a contribution which the inventions, considered as a whole, make over the prior art.

Continuation of: Electronic database consulted during international research

DERWENT, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPEU, TXPEY, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, NPL, MEDLINE, XP3GPP, XPIETF, XPIPCOM, XPJPEG, XPMISC, XPOAC, XPTK, PUBCOMP, PUBSUBS, TDB.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2017/000064

BR 102014027984 A2	2016-06-07	WO 2016070258 A1	2016-05-12
-----	-----	-----	-----
BR 102014014407 A2	2016-04-19	EP 3165609 A1	2017-05-10
		US 2017114350 A1	2017-04-27
		WO 2015188244 A1	2015-12-17
-----	-----	-----	-----
US 2012329104 A1	2012-12-27	KR 20130007687 A	2013-01-21
-----	-----	-----	-----
US 2009246857 A1	2009-10-01	US 8652772 B2	2014-02-18
		AU 2830197 A	1997-11-26
		AU 731102 B2	2001-03-22
		BR 9710963 A	2001-07-31
		CA 2253581 A1	1997-11-13
		CA 2661090 A1	1997-11-13
		CN 1225125 A	1999-08-04
		CN 1238490 C	2006-01-25
		EP 0898616 A1	1999-03-03
		ID 16873 A	1997-11-20
		IN 191596 B	2003-12-06
		JP 2000509988 A	2000-08-08
		JP 4321878 B2	2009-08-26
		JP 2009148277 A	2009-07-09
		UA 76690 C2	2004-12-15
		US 7527927 B1	2009-05-05
		WO 9742307 A1	1997-11-13
-----	-----	-----	-----
US 5866382 A	1999-02-02	AT 161886 T	1998-01-15
		AU 7565791 A	1991-10-30
		AU 647104 B2	1994-03-17
		CA 2090122 A1	1991-10-07
		DE 69128619 D1	1998-02-12
		DK 0527758 T3	1998-09-07
		ES 2113373 T3	1998-05-01
		FI 924461 A	1992-10-02
		FI 104636 B	2000-03-15
		FI 19992153 A	1999-10-06
		FI 112250 B	2003-11-14
		FI 901771 A	1991-10-07
		GR 3026489 T3	1998-07-31
		JP H05507843 A	1993-11-11
		JP 3348215 B2	2002-11-20
		NO 923880 A	1992-10-06
		NO 308544 B1	2000-09-25
		US 6582944 B1	2003-06-24
		WO 9115588 A1	1991-10-17
-----	-----	-----	-----

## A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

**C12N 15/53 (2006.01), C12N 15/81 (2006.01), C12N 1/19 (2006.01), C12N 1/22 (2006.01), C12P 7/10 (2006.01), C12R 1/85 (2006.01), C12R 1/865 (2006.01)**

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

## B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

**C12P**

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

**Google, Base de patentes do INPI-BR (SINPI), Plataforma Lattes (<http://lattes.cnpq.br/>)**

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

**GENESEQ, USGENE, WOGENE, GenBank, EPODOC (continua em folha suplementar)**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	KARHUMAA, K. <i>et al.</i> Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using metabolic engineering. Yeast. 2005. Vol. 22, No. 5, páginas : 359-68. doi: 10.1002/yea.1216. Resumo, Tabela 1, primeiro parágrafo da seção "Resultados", primeira coluna da página 362, primeiro parágrafo da página 364. -----	1 a 7
X Y	BR 102014027984 A2 (BIOCELERE AGROINDUSTRIAL LTDA [BR]) 07 junho 2016 (2016-06-07) Resumo, parágrafos [0051], [0059], [0064], [0080], [0082], Tabela 1, SEQ ID nºs 4 e 9. -----	2 1, 3 a 7

Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C

Ver o anexo de famílias das patentes

\* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

**22/08/2017**

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

01/09/2017

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA  
PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar  
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax:

+55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

**Flávia Riso Rocha**

Nº de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
Y	ELIASSON, A. <i>et al.</i> Anaerobic xylose fermentation by recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. <i>Appl Environ Microbiol.</i> 2000. Vol. 66, no. 8, páginas: 3381- 3386. PMID: PMC92159. Resumo, seção “Materiais e Métodos”, Figura 1, linhas 2 a 6 da segunda coluna da página 3381.	1 a 7
X	KARHUMAA, K. <i>et al.</i> Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Microb Cell Fact.</i> 2007. Vol. 6:5. doi: 10.1186/1475-2859-6-5. Resumo, segunda coluna da página 2, Tabelas 1 a 4, Figuras 3 e 4.	1 a 7
Y X	HAHN-HAGERDAL, B. <i>et al.</i> Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. <i>Appl Microbiol Biotechnol.</i> 2007. Vol. 74, No. 5, páginas: 937-53. doi: 10.1007/s00253-006-0827-2. Resumo, primeiro parágrafo completo da segunda coluna da página 942, linhas 4 a 7 da página 948, Tabelas 2 e 3.	1 a 3 4 a 7
X Y	BR 102014014407 A2 (BIOCELERE AGROINDUSTRIAL LTDA [BR]) 19 abril 2016 (2016-04-19) Resumo, parágrafos [0011], [0023], [0025], [0027], [0077], Tabela 1, SEQ ID n°s 4, 9.	2 1, 3 a 7
Y	US 2012329104 A1 ( SAMSUNG ELECTRONICS CO LTD [KR]) 27 dezembro 2012 (2012-12-27) Citado na descrição. Resumo, parágrafos [0044], [0046], [0048], [0060] a [0063], [0066], Exemplo 2, quadro reivindicatório, Figura 2.	1 a 7
Y	US 2009246857 A1 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION [US] ) 01 outubro 2009 (2009-10-01) Resumo, parágrafos [0045] a [0054], quadro reivindicatório.	1 a 7
Y A	JOHANSSON, B. & HAHN-HAGERDAL, B. Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Yeast.</i> 2002. Vol. 19, No. 3, páginas :225-231. doi: 10.1002/yea.833. Resumo, seção “Materiais e Métodos”, seção “Discussão”, primeiro parágrafo da seção “Introdução”, Figura 1.	1 a 3 4 a 7
Y A	GUELDERER, U. <i>et al.</i> A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. <i>Nucleic Acids Res.</i> 2002. Vol. 30, N°6:e23. PMID: 11884642. Resumo, Figura 1.	1 a 3 4 a 7
Y A	US 5866382 A (XYROFIN OY [FI]) 02 fevereiro 1999 (1999-02-02) Resumo, terceiro parágrafo da coluna 3, exemplos, quadro reivindicatório, Figuras 5 e 8.	1, 3 a 7 2

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
A Y	TRAFF, K. L. <i>et al.</i> Deletion of the GRE3 aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressing the xylA and XKS1 genes. <i>Appl Environ Microbiol.</i> 2001. Vol. 67, páginas: 5668–5674. Resumo, seções “Materiais e Métodos” e “Discussão”. -----	1 e 3 2, 4 a 7

**Quadro II Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)**

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2).a), pelas seguintes razões:

1.  Reivindicações:

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

2.  Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3.  Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com a segunda e terceira frase da Regra 6.4.a).

**Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)**

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

O presente depósito internacional não se refere a uma única invenção ou a um grupo de invenções interligadas de modo a constituir um único conceito inventivo, estando, desse modo, em desacordo com a Regra 13 do PCT.

A matéria reivindicada pode ser agrupada em quatro invenções:

1- cassete de expressão gênica (SEQ ID n° 1), compreendendo, dentre outros, sequência codificadora para xilose redutase (XR) de *S. stipitis*, para xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis*, além de gene *URA3* (reivindicação 1);

2- cassete de expressão gênica (SEQ ID n° 2), compreendendo, dentre outros, sequência codificadora para xiluloquinase (XKS) de *S. cerevisiae* e gene *URA3* (reivindicação 2);

3- cassete de expressão gênica (SEQ ID n° 3), compreendendo, dentre outros, sequência codificadora para XDH de *S. stipitis*, além de gene *URA3* (reivindicação 3); **(continua em folha suplementar)**

1.  como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.
2.  como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.
3.  como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:
4.  as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

**Observações da reclamação**

- as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.
- as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.
- o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

**Quadro Suplementar**

**No caso do espaço em qualquer quadro precedente não for suficiente.**

Continuação de: Quadro III

4- levedura geneticamente modificada DSM32120, processo de obtenção de etanol 2G empregando tal levedura e seu uso em qualquer processo que envolva o consumo de xilose (reivindicações 4 a 7).

O motivo pelo qual se considerou que as invenções acima mencionadas não estão conectadas por um único conceito inventivo geral, conforme requerido pela Regra 13 do PCT, são abaixo discutidos.

Os cassetes de expressão pleiteados pelas reivindicações 1, 2 e 3 apresentam construções distintas. Por sua vez, a levedura DSM32120 (LVY127) foi obtida a partir da transformação, com as construções ensinadas, da linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 com o gene *GRE3* removido (parágrafos [53], [59] e Figura 1). O único elemento em comum entre os cassetes de expressão pleiteados é a presença do gene marcador *URA3*, juntamente com seu promotor e terminador, flanqueado pelos sítios *loxP*. Entretanto, tal característica não configura uma característica técnica especial, tendo em vista que é usual do estado da técnica a adoção de tal construção de modo a permitir a seleção de colônias após transformação (através do gene *URA3* como marcador) e uso do mesmo marcador de seleção para múltiplas inserções gênicas, conforme pode ser ilustrado por Johansson, B. & Hahn-Hagerdal, B. (Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2002. Vol. 19, No. 3, páginas :225-231. doi: 10.1002/yea.833: Resumo, seção "Materiais e Métodos", seção "Discussão", primeiro parágrafo da seção "Introdução", Figura 1.)

Embora o relatório descritivo ensine que os cassetes de expressão pleiteados pelas reivindicações 1 a 3 tenham sido empregados para a geração da linhagem DSM32120, objeto das reivindicações 4 e 5, os referidos cassetes de expressão também poderiam ser utilizados isoladamente para fins distintos desse (geração de outras linhagens de levedura, por exemplo).

Conclui-se, portanto, que não é possível determinar, para as invenções acima definidas, uma característica técnica especial, ou seja, uma característica técnica comum que defina uma contribuição que as invenções, consideradas como um todo, trazem ao estado da técnica.

**Quadro Suplementar**

**No caso do espaço em qualquer quadro precedente não for suficiente.**

Continuação de: Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional

DERWENT, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES,  
TXPEU, TXPEY, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPWOEA, NPL, MEDLINE, XP3GPP, XPIETF,  
XPIPCOM, XPJPEG, XPMISC, XPOAC, XPTK, PUBCOMP, PUBSUBS, TDB.

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**  
 Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional N°

PCT/BR2017/000064

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
BR 102014027984 A2	2016-06-07	WO 2016070258 A1	2016-05-12
-----	-----	-----	-----
BR 102014014407 A2	2016-04-19	EP 3165609 A1	2017-05-10
		US 2017114350 A1	2017-04-27
		WO 2015188244 A1	2015-12-17
-----	-----	-----	-----
US 2012329104 A1	2012-12-27	KR 20130007687 A	2013-01-21
-----	-----	-----	-----
US 2009246857 A1	2009-10-01	US 8652772 B2	2014-02-18
		AU 2830197 A	1997-11-26
		AU 731102 B2	2001-03-22
		BR 9710963 A	2001-07-31
		CA 2253581 A1	1997-11-13
		CA 2661090 A1	1997-11-13
		CN 1225125 A	1999-08-04
		CN 1238490 C	2006-01-25
		EP 0898616 A1	1999-03-03
		ID 16873 A	1997-11-20
		IN 191596 B	2003-12-06
		JP 2000509988 A	2000-08-08
		JP 4321878 B2	2009-08-26
		JP 2009148277 A	2009-07-09
		UA 76690 C2	2004-12-15
		US 7527927 B1	2009-05-05
		WO 9742307 A1	1997-11-13
-----	-----	-----	-----
US 5866382 A	1999-02-02	AT 161886 T	1998-01-15
		AU 7565791 A	1991-10-30
		AU 647104 B2	1994-03-17
		CA 2090122 A1	1991-10-07
		DE 69128619 D1	1998-02-12
		DK 0527758 T3	1998-09-07
		ES 2113373 T3	1998-05-01
		FI 924461 A	1992-10-02
		FI 104636 B	2000-03-15
		FI 19992153 A	1999-10-06
		FI 112250 B	2003-11-14
		FI 901771 A	1991-10-07
		GR 3026489 T3	1998-07-31
		JP H05507843 A	1993-11-11
		JP 3348215 B2	2002-11-20
		NO 923880 A	1992-10-06
		NO 308544 B1	2000-09-25
		US 6582944 B1	2003-06-24
		WO 9115588 A1	1991-10-17
-----	-----	-----	-----