



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

(11) PI 0908308-1 B1



(22) Data do Depósito: 06/05/2009

(45) Data de Concessão: 12/01/2021

(54) Título: CEPA H. POLYMORPHA, E PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DE ETANOL

(51) Int.Cl.: C12N 1/19; C12N 15/56; C12P 7/06; C12R 1/01.

(30) Prioridade Unionista: 24/03/2008 US 61/050,685.

(73) Titular(es): ARCHER DANIELS MIDLAND COMPANY..

(72) Inventor(es): ANDRIY Y. VORONOVSKY; CHARLES ABBAS; ANDRIY SIBIRNY.

(86) Pedido PCT: PCT US2009042975 de 06/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/137574 de 12/11/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 05/11/2010

(57) Resumo: CEPA FI. POLYMORPHA, PROCESSO PARA a FABRICAÇÃO DE E- TANOL E ÁCIDO NUCLÉICO RECOMBINANTE Os genes SWA2 e GAMI ãa levedura, Schwanniomyces occidentalis, que encoãifica (Alfa)-arnilase e glucoamilase, respectivamente, foram clonados e expressos na H. polymorpha. A expressão foi obtida pela integração dos genes SWA2 e GAMI no cromossomo de H. polymorpha sob ligação de modo operável a um promotor constitutivamente forte do gene de H. polymorpha - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (HpGAP). Os transformantes resultantes adquiriram a habilidade de serem cultivados em um meio mínimo que contém amido solúvel como única fonte de carbono e pode produzir Etanol em fermentação de alta temperatura a partir do amido até 10 g/l. Um gene XYN2 que encodifica a endoxilanase foi obtido a partir do fungo Trichoderma reseei, e um gene xlnD que codifica para a ss-xilosidase foi obtido a partir do fungo Aspergillus niger.; A co-expressão destes genes foi também atingida pela integração no cromossomo de H. poly-morpha sob o controle do promotor HpGAP. Os transformantes resultantes puderam crescer em um meio mínimo suplementado com xilana de madeira de vidoeiro como única fonte de carbono. A expressão satisfatória de enzimas xilanolíticas resultou em uma cepa receptora que propicia a (...).

CEPA H. POLYMORPHA, E PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DE ETANOL

PRIORIDADE E REFERÊNCIAS INCORPORADAS

[001]O presente pedido reivindica prioridade para o pedido provisório nº U.S. 61/050.685, depositado em 06 de maio, 2008, que está incorporado integralmente a título de referência, incluindo-se no mesmo todas as referências citadas naquele documento (repetidas no presente), nos limites em que tais referências ajudem na compreensão da invenção ou na obtenção de materiais e métodos que possam facilitar a prática da invenção. Se o conteúdo de uma referência citada entrar em conflito com o ensinamento do presente pedido, esse deve prevalecer.

CAMPO DA TÉCNICA

[002]O presente pedido refere-se ao campo da produção de etanol celulósico por fermentação, particularmente a fermentação de fontes de amido e carbono xilana, ainda, mais particularmente, a cepas de *H polymorpha* recombinante úteis para a produção de etanol por fermentação em amido e xilana e, ainda mais particularmente, a cepas de *H. polymorpha* que excretam α -amilase (SEQ ID NO: 2) e glucoamilase (SEQ ID NO:4) recombinantes, e/ou xiloidrolase e xilosidase para alcançarem a produção de etanol por fermentação em meio contendo amido e xilana.

INTRODUÇÃO

[003]A produção de etanol para combustível a partir de matérias-primas renováveis, tal como a biomassa de plantas, é de grande relevância Econômica e Ecológica. As lignoceluloses de planta são potenciais cargas alternativas à sacarose e aos polissacarídeos com base de amido que são comum e amplamente utilizadas para a produção de bioetanol. A lignocelulose e outros polissacarídeos derivados de plantas representam uma fonte

de energia renovável sustentável que pode ser reproduzida pela bioconversão de dióxido de carbono. Um dos muitos benefícios ambientais visados em relação a bicomcombustíveis produzidos a partir de plantas em relação aos combustíveis fósseis é a redução significativa de gases do efeito estufa [6, 24].

[004]A maior parte do etanol produzido no mundo atualmente é derivada de amido ou sacarose. Amidos e açúcares são abundantes em muitas colheitas, mas a expansão da produção de etanol como um combustível líquido de transporte vai exigir matérias-primas que não concorram diretamente com usos de alimentos e de alimentação para animais. Tais matérias-primas incluem resíduos de subproduto de lignocelulose da agricultura e silvicultura [14].

[005]A palavra lignocelulose é um termo genérico para a matéria de plantas derivada de resíduos agrícolas e de madeira. É composta principalmente de lignina e celulose, assim como quantidades significativas de hemicelulose com quantidades menores de proteínas estruturais e matéria orgânica solvente passível de extração [14]. A hemicelulose é um polissacarídeo substituído que consiste em xilana como cadeia principal e está presente nas paredes celulares de plantas [H].

[006]O processamento de lignocelulose e amido para etanol consiste em quatro operações principais: pré-tratamento, hidrólise, fermentação, e separação/purificação do produto. A bioconversão do amido envolve a hidrólise e a fermentação enzimática da glicose resultante em etanol com a produção de coprodutos de alimentação animal. A hidrólise de lignocelulose é mais difícil devido a esta estrutura mais complexa e a grande variação nesta composição em diferentes plantas (cereais, madeiras moles, madeiras duras, etc.) e dentro de uma planta

(caules, cascas, palhas, sabugos, forragem, folhas, cernes, etc.) [14]. A xilose é o maior açúcar de pentose obtido sob hidrólise de fração de hemicelulose com L-arabinose C5 e outros açúcares C6 tais como glicose, manose, galactose como as hexoses primárias [11].

[007]Devido a muitas etapas envolvidas e os altos aportes de energia requeridos para processar a lignocelulose, o desenvolvimento de tecnologias mais diretas e baratas são necessárias para a viabilidade comercial de lignoceluloses como matérias-primas. A conversão microbiana direta (DMF, *D*irect *M*icrobial *F*ermentation (Fermentação Microbiana Direta)) de polímeros de carboidratos é uma opção que pode melhorar a Economia de produção de bioetanol a partir de lignocelulose. Um dos pré-requisitos chave para o desenvolvimento desta tecnologia é a obtenção de microorganismos podem fermentação direta de amido e xilana para etanol em temperaturas elevadas [15]. A temperatura ótima das enzimas hidrolíticas atuais envolvidas em DMF é aproximadamente 50°C onde a maioria dos microorganismos utilizados atualmente na produção de bioetanol a partir de lignocelulose e açúcares de amido são mesófilos com ótimo crescimento e temperaturas de fermentação entre 28 e 40°C [6].

[008]Estudos recentes em laboratórios indicam que a levedura metilotrófica termotolerante, *Hansenula polymorpha*, é capaz de fermentar D-xilose e D-glicose para etanol em temperaturas elevadas (37 a 48° C). Em vista de sua alta temperatura ótima para crescimento e fermentação, a *H. polymorpha* é uma boa candidata para um desenvolvimento posterior de tecnologia DMF [3, 26]. Já que a *H. polymorpha* não pode utilizar amido e xilana como fontes de carbono e energia, a clonagem e a expressão excessiva de genes xilanolíticos e amilolítico heterólogos nes-

ta levedura são necessárias.

[009]As β -1,4-xilanas são polissacarídeos heterogêneos encontrados na maioria das partes das paredes celulares das plantas. Os monômeros de xilose ligante de β -1.4 formam uma cadeia principal na qual diversos substituintes são anexados [30]. A hidrólise da cadeia principal de xilana é catalisada por endo- β -1,4-xilanases (1,4- β -D-xilana xilana hidrolase, EC 3.2.1.8) e β -D-xilosidases (1,4- β -D-xilana xiloidrolase, EC 3.2.1.37). As endo- β -xilanases agem em xilanas e xilo oligossacarídeos, produzindo principalmente misturas de xilo oligossacarídeos. As β -D-xilosidases hidrolisam os xilo oligossacarídeos como D-xilose [19]. Os fungos *Trichoderma* e *Aspergillus* secretam grandes quantidades de enzimas degradantes de xilana eficientes. O *Trichoderma reesei* é um fungo mesofílico filamentoso conhecido por suas atividades celulolítica e xilanolítica [3]. As duas maiores endo-xilanases passíveis de indução secretadas por este fungo são Xyn1 e Xyn2. A Xyn2 (SEQ ID NO: 7) representa mais de 50% do total da atividade xilanolítica de *T. reesei* cultivado em xilana. Os membros do gênero *Aspergillus* são também eficientes produtores de enzimas celulolíticas e xilanolíticas. O gene *xlnD* de *A. niger* codificando o 804-aminoácido β -xilosidase foi expresso na levedura com sucesso [19].

[010]O amido é composto de duas frações de peso molecular alto: amilose e amilopectina. A amilose, o menor componente (20 a 30%) é um polissacarídeo linear formado por resíduos de glicose ligante α -1,4 e pontos de ramificação α -1.6, enquanto que a amilopectina representa a maior fração de amido (70-80%) e é altamente ramificada [4]. O amido é degradado por duas amilases secretadas: α -amilase (SEQ ID NO: 2) e a glucoa-

amilase (SEQ ID NO:4) [25]. A α -amilase (SEQ ID NO: 2) (1,4- α -D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) catalisa a clivagem de endoamilolítico de ligações de α -1,4 glicosídicas de substrato de amido e similares que liberam maltose, oligossacarídeos e limitam as dextrinas. A glucoamilase (1,4- α -D-glucano-glucoidrolase, EC 3.2.1.3) (SEQ ID NO:4) hidrolisa os gluco-oligossacarídeos e maltose para D-glicose. A levedura *Schwanniomyces occidentalis* produz enzimas amilolíticas e fermenta o amido em etanol com alta eficiência [34]. A α -amilase (SEQ ID NO: 2) secretada por esta levedura é codificada pelo gene *SWA2* (SEQ ID NO: 1). O gene *GAM1* (SEQ ID NO: 3) codifica a glucoamilase (SEQ ID NO:4) secretória.

[011]Alguns resíduos agrícolas de lignocelulose obtidos no processamento de grãos de cereal tais como milho (exemplo: cascas fibrosas de milho) contêm uma quantidade significativa de amido. Por esta razão o desenvolvimento de cepas microbiais pela conversão direta ativa tanto de amido quanto de lignocelulose em etanol é de grande significância comercial.

DESCRIÇÃO RESUMIDA

[012]Aqui são descritas as cepas de *H. polymorpha* amilolítica e xilanolítica com capacidade de fermentação alcoólica diretas de amido e xilana. A construção das cepas pela inserção eficaz nos cromossomos e expressão dos genes *Scw. occidentalis SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3), *T. reesei XYN2* e *A. niger xlnD* nesta levedura. Além disso, uma cepa que expresse excessivamente piruvato descarboxilase (PDC) foi projetada com um ou mais destes genes. Em cada caso, as cepas conseguiram crescer apenas em um meio que contém ou amido solubilizado ou xilana solubilizada e conseguiram fermentar as mesmas em etanol em vários níveis. As cepas que também expressaram ex-

cessivamente PDC apresentaram títulos mais altos de etanol que as cepas que apenas expressaram excessivamente os genes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3).

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[013]Figura 1. Os Esquemas lineares dos plasmídeos pGAM1 (SEQ ID NO: 3) (~ 6,63 kb), pGAM1 (SEQ ID NO: 3)*SWA2* (SEQ ID NO: 1) (~ 9,1 kb), pOR1 (~10,8 kb) e pOR11 (~10 kb). O fragmento de genoma *S. cerevisiae* que contém o gene *LEU2* é apresentado como caixa cinza, o promotor *HpGAP* é apresentado como caixa verde, o terminal *HpAOX*: caixa laranja, o ORF do gene *GAM1* (SEQ ID NO: 3) é apresentado como caixa azul, o ORF do gene *SWA2* (SEQ ID NO: 1): caixa vermelha, o gene aminoglicosídeo 3-fosfotransferase (APH):caixa preta. Sítios de restrição:H, *Hind* III; RV, *EcoRV*; K, *Kpn*; RI, *EcoR* I; Sl, *Sal* I; BI, *BamH* I; Bg, *Bgl* II; Sc, *Sac* I; P, *Pst* I; Sm, *Sma* I.

[014]Figura 2. Os Esquemas lineares dos plasmídeos pK08-GAPpr (7,6 kb), pK08-GAPpr_*SWA2* (SEQ ID NO: 1) (9,1 kb) e pK08-GAPpr_XYN2 (8,27 kb). O fragmento de genoma *S. cerevisiae* que contém o gene *LEU2* é apresentado como caixa cinza, o promotor *HpGAP* é apresentado como caixa amarela, o terminal *HpAOX*:caixa azul, o ORF do gene *SWA2* (SEQ ID NO: 1):caixa vermelha, o ORF do gene *TrXYN2*:caixa laranja. Sítios de restrição:H, *Hind* III; Nd, *Nde* I; K, *Kpn* I; RI, *EcoR* I; Sl, *Sal* I; BI, *BamH* I; Bg, *Bgl* II; Sc, *Sac* I; P, *Pst* I; Nt, *Not* I.

[015]Figura 3. Os Esquemas lineares de plasmídeos pXYN2 (~ 4,24 kb), pXYN2xlnD (~ 7,61 kb) e pOR2 (~9,57 kb). Caixa cinza, o fragmento de genoma *S. cerevisiae* que contém o gene *LEU2*; caixa verde, o promotor *HpGAP*; caixa laranja, o terminal *HpAOX*; caixa azul, o fragmento que contém ORF de um gene *A. niger* xlnD; caixa vermelha, o fragmento que contém ORF de

gene *T. reesei* XYN2. Sítios de restrição: H, *Hind* III; RV, *EcoRV*; K, *Kpn* I; RI, *EcoR* I; Sl, *Sal* I; B, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; Sc, *Sac* I; P, *Pst* I; Sm, *Sma* I; Xb, *Xba*I; Sp, *Sph* I.

[016]Figura 4. A produção de etanol pelos recombinantes de *H. polymorpha*, 2Eth- *leul-1*/pOR 1 # 14' (A) e # 7 (B) no meio YNB mínimo com 2 % de amido solúvel como única fonte de carbono com meio de pH:1 diferente- sem pH adjacente; 2 - pH 6; 3 - pH 5,5; 48° C, 135 rpm.

[017]Figura 5. A produção de etanol pela cepa recombinante de *H. polymorpha* 495 2Eth- *leul-1*/pOR2 no meio YNB mínimo com 3% ou 9% xilana de madeira de vidoeiro com meio de pH diferente (A) e condições de aeração (B). 48° C.

[018]Figura 6. A demonstração de genes *GAM1* (SEQ ID NO: 3), *SWA2* (SEQ ID NO: 1), *XYN2* (SEQ ID NO: 7), e *xlnD* sob o promotor de *HpGAP* em DNA genômico de transformadores de *H. polymorpha* por meio de PCR. Banda ## 2, 3: no par de iniciadores K43, Ko51 foi utilizado para análise dos transformantes obtidos pela transformação com plasmídeo pOR2 para mostrar o construto artificial: *T. reesei* XYN2 ORF fundido com promotor *HpGAP* e terminal *HpAOX*. Banda ## 4, 5: o par de iniciadores K43, Ko47 foi utilizado para análise dos transformantes obtidos por plasmídeo pOR2 para apresentar o construto: *A. niger* *xlnD* fundido com o promotor *HpGAP*. Banda ## 6,7: o par de iniciadores K43, Ko49 foi utilizado para análise do transformante obtido por plasmídeos pOR1 e pOR11 para mostrar o construto: *GAM1* (SEQ ID NO: 3) de *Scw. occidentalis* fundido com o promotor *HpGAP1*. Banda ## 8, 9: o par de iniciadores K43, Ko50 foi utilizado para análise dos transformantes obtidos por plasmídeos pOR1 e pOR11 para mostrar o construto: ORF de *Scw. occidentalis* *SWA2* (SEQ ID NO: 1) fundido com o promotor *HpGAP1* e terminador *HpAOX*. Banda

1, 10: marcadores DNA.

[019]Figura 7. A Formação de halos claros pelos recombinantes de *H. polymorpha* que expressam os genes *Scw. occidentalis SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) conduzidos pelo promotor *HpGAP1*. A cepa de controle *Scw. occidentalis* não produz um halo no meio suplementado com glicose (B) devido à repressão de promotores nativos de genes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3). A segunda cepa de controle 2Eth⁻ *leul-1* não pode crescer no meio com amido como única fonte de carbono (A).

[020]Figura 8. A produção de etanol por cepas recombinantes de *H. polymorpha* 2Eth⁻ *leul-1*/pOR1 ## 7 e 14' no meio YNB mínimo com 2% do amido solúvel, 48° C, 135 rpm.

[021]Figura 9. A análise SDS-PAGE de meio cultural das cepas recombinantes # 7, 14 (495 2Eth⁻ *leul-1*/pOR1), 1', 2' 4', 2g (495 2Eth⁻ *leul-1*/pOR11) e cepa receptora 495 2Eth⁻ *leul-1*. A Eletroforese foi realizada com o uso de um gel de separação 8%, bandas de proteína foram visualizadas por mancha Coomassie e Silver. A, visualização de glucoamilase; B, visualização de α -amilase (SEQ ID NO: 2); as bandas difusas de α -amilase (SEQ ID NO: 2) presumidamente são devido às diferenciações de graus de glicosilação. L, marcador de peso molecular de proteína.

[022]Figura 10. A Formação de halos claros pelos recombinantes de *H. polymorphas* ##7, 14 (495 2Eth⁻ *leul-1*/pOR1) e integrantes de multicópias ## 1', 2', 3', 4' e 2g (495 2Eth⁻ *leul-1*/pOR11).

[023]Figura 11. Resultados de hibridização Southern dot-blot que ilustra um número de cópia de genes codificando enzimas amilolíticas em transformantes de *H. polymorpha*. O promotor *HpGAP* foi utilizado como uma sonda. Cepas: 1 - wt (1 cópia padrão); 2, 3 - ## 7, 14 (aproximadamente 3 a 4 cópias); 4, 5,

7 - ## 1', 2', 4', respectivamente (aproximadamente 6 a 8 cópias); 6 - # 3' (~3 cópias).

[024]Figura 12. A Atividade específica de α -amilase (SEQ ID NO: 2) (A) e glucoamilase (SEQ ID NO:4) (B) em meio cultural de cepas de levedura recombinantes ## 7, 14, 6 (495 2Eth⁻ *leul*-1/pOR1) contendo 3 a 4 cópias de genes de amilase e ## 1', 2' 4', 2g (495 2Eth⁻ *leul*-1/pOR11) contendo 6 a 8 cópias dos genes.

[025]Figura 13. A produção de etanol pelos recombinantes de *H. polymorpha* 2Eth⁻ *leul*-1/pOR1 (# 1: um meio de produção de etanol das cepas ## 7 e 14) e 2Eth⁻ *leul*-1/pOR11 (# 2: um meio de produção de etanol das cepas ## 1', 2', 4', 2g). As cepas foram cultivadas em meio YNB mínimo com 3% de amido solúvel de pH 5,5, 48° C, 135 rpm.

[026]Figura 14. A produção de etanol pelas cepas de *H. polymorpha* que expressem excessivamente os genes de enzimas amilolíticas e gene *PDC1* no meio mínimo com 3% amido solúvel; 48°C, 135 rpm. 4', os transformantes 495 2Eth⁻ *leul*-1/pOR11 (cepas de recipiente, controle); 6p, 10, 12, as transformantes 4'/ploxZeoloxPDC1Hp.

[027]Figura 15. A Formação de halos claros pelo recombinante de *H. polymorpha* #6p (4'/ploxZeoloxPDC1Hp) e seus derivados: integrantes ## 1, 2, 2-1, 3, 4, 5, 7, 9, 10 (6p/pOR1).

[028]Figura 16. A produção de etanol pelas cepas de cepa de *H. polymorphas* que expressam excessivamente as enzimas amilolíticas e Pdc1p em meio mínimo com 3% de amido solúvel em 47°C com aeração restrita. 4', o transformante 495 2Eth⁻ *Ieu1*-1/pOR11; 6p, o transformante 4'/pZeoloxPDC1Hp; 3, 4, 5, os transformantes 6p/pOR1.

[029]Figura 17. O crescimento de recombinantes de *H. polymorpha* que expressam genes endoxilanase (SEQ ID NO: 8) e β -xilosidase (SEQ. ID NO 6) no meio com a xilana como única fonte de carbono. A, Crescimento das cepas recombinantes que expressam genes de endoxilanase e β -xilosidase (cepas ## 6x e 8x) em meio sólido com xilana como única fonte de carbono. B, Acúmulo de biomassa por cepas que expressam genes de endoxilanase (SEQ ID NO: 8) e β -xilosidase (SEQ. ID NO 6) durante o crescimento em meio mínimo líquido com 3% de xilana de madeira de vidoeiro (B1) ou 2% de xilose (B2), 48°C, 240 rpm. 6x, 8x, os transformantes 495 2Eth⁻ *leu1-1*/pOR2.

[030]Figura 18. Formação de halos amarelos (A) ou claros (B) pelos recombinantes de *H. polymorpha* que expressam os genes *A.niger xlnD* e *T.reseei XYN2*.

[031]Figura 19. Atividade específica de endoxilanase (A) e β -xilosidase (B) em cultura de meio de cepas recombinantes de *H. polymorpha* 495 2Eth⁻/pOR2 ## 6x e 8x.

[032]Figura 20. A. sequência de construtos recombinantes que contém o promotor GAP de *H. polymorpha* (sublinhado simples) de modo operável ligado ao gene *SWA2* (SEQ. ID NO 1) e ao terminal AOX de *H. polymorpha* AOX (sublinhado duplo). B. A sequência de aminoácido de α -amilase (SEQ. ID NO 2) de *Schwanniomyces occidentalis* codificado pelo gene *SWA2* (SEQ ID NO: 1).

[033]Figura 21. A. Sequência de um construto recombinante que contém o promotor GAP de *H. polymorpha* GAP (sublinhado simples) ligado de maneira operável a um gene *GAM1* (SEQ. ID NO 3) e ao terminal AOX de *H. polymorpha* (sublinhado duplo). B. Sequência de aminoácido da glucoamilase (SEQ. ID NO 4) de *Schwanniomyces occidentalis* codificada pelo gene *GAM1* (SEQ ID NO: 3).

[034]Figura 22. A. Sequência de um construto recombinante que contém o promotor GAP de *H. polymorpha* (sublinhado simples) ligado de modo operável a um gene *xlnD* (SEQ. ID NO 5) de *A. niger* incluindo sua sequência de terminal endógeno (SEQ. ID NO 9, sublinhado duplo). B. Sequência de aminoácido de β -xilosidase (SEQ. ID NO 6) codificada pelo gene *xlnD*.

[035]Figura 23. A. Sequência de um construto recombinante que contém o promotor GAP de *H. polymorpha* (sublinhado simples) ligado de modo operável a um gene *Xyn2* (SEQ. ID NO 7) de *Trichoderma reesei* incluindo sua sequência de terminal endógeno (SEQ. ID NO 10, sublinhado duplo). B. Sequência de aminoácido de endo- β -xilanase (SEQ. ID NO 8) codificado pelo gene *Xyn2*.

[036]Descrição Detalhada de Métodos, Cepas e Resultados

[037]Cepas e Meios.

[038]A cepa de *H. polymorpha* 495 2Eth⁻ *leu1-1* deficiente de β -isopropilamato desidrogenase e que não consegue crescer em etanol [14], foi utilizada como recipiente para isolamento dos recombinantes amilolíticos e xilanolíticos. Esta cepa é um derivativo de NCYC 495 *leu1-1* [8]. Cepas e transformantes de levedura cresceram em YPD (0,5% extrato de levedura, 1% peptona, 2% glicose) ou meio mínimo (0,67% YNB sem aminoácidos, 2% glicose, 3% amido solúvel (Sigma S2630-500G) ou 3% xilana de madeira de vidoeiro (Fluka X0502-100G) em 37°C ou 48 °C. Para a cepa 495 2Eth⁻ *leu1-1*, leucina (40 mg/l) foi adicionada ao meio. Para a seleção de transformantes de levedura em YPD, 0,2 mg/l de G418 (geneticina) ou 150 μ g/ml de zeocina foram adicionados.

[039]A cepa *E. coli* DH5 α [ϕ 80dI α CZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r⁻_k, m⁺_x), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (lac- ZYA-

argF)U169] foi utilizada como hospedeira para propagação de plasmídeos. A cepa cresceu em 37°C em meio LB tal como descrito previamente [27]. Células transformadas *E. coli* foram mantidas em um meio que contém 100 mg/L de ampicilina.

Técnicas de DNA.

[040]Técnicas padrão de clonagem foram aplicadas [27]. Isolamento de DNA plasmídeo de *E. coli* foi experimentado com o Sistema de Purificação de DNA Minipreps Wizards Plus SV (Promega, Madison, WI, E.U.A). O DNA genômico de *H. polymorpha*, *Scw. occidentalis*, *T. reesei* e *A. niger* foi isolado utilizando o Kit de Purificação Wizards DNA genômico (Promega, Madison, WI, E.U.A). As endonucleases de restrição, ligase de DNA T4 e polimerase de DNA T4 (Fermentas, Vilnius, Lituânia) foram utilizadas de acordo com as especificações do fabricante. Os fragmentos de DNA foram separados em 0,8% gel de agarose (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, E.U.A) em 1xTAE [27]. O isolamento de fragmentos de gel foi executado com Kit de Extração de DNA (Millipore, Bedford, MA, E.U.A). polimerase de DNA *Taq* e Polimerase de Mistura com Alta Fidelidade (Fermentas, Vilnius, Lituânia) foram utilizados para PCR analítico e preparativo, respectivamente. Os PCRs foram executados em termociclador GeneAmps PCR Sistema 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A). A transformação de levedura *H. polymorpha* pela eletroporação foi executada como foi descrito acima [5], A construção de plasmídeos transportando os genes de α -amilase (*SEQ ID NO: 2*) e glucoamilase de *Scw. occidentalis*.

[041]O quadro aberto de leitura (ORF) junto com o terminal nativo do gene *GAM1* (*SEQ ID NO: 3*) codificando glucoamilase (~3,27 kb) foi isolado do DNA genômico da cepa *Schw. occidentalis* NRRL Y-2470 pelo uso de iniciadores PCR Ko48 (CCC

AAG CTT ATG ATT TTT CTG AAG CTG) e Ko49 (GGA AGA TCT TTC TTT ACA AGA CCA ATG). Os sítios de restrição *Hind* III e *Bgl* II foram incorporados aos iniciadores Ko48 e Ko49 (os sítios de clivagem estão sublinhados). O produto PCR foi digerido com endonucleases de restrição *Hind* III e *Bgl* II e posto sob o promotor forte constitutivo do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*HpGAPpr*), digerido com *Hind* III e *Bam* HI. O construto *HpGAPpr+GAM1* (SEQ ID NO: 3) foi inserido em um sítio *Bam* HI do plasmídeo pUC57 por meio de ligação dupla. O plasmídeo resultante foi nomeado como *pGAM1* (SEQ ID NO: 3) e utilizado como vetor para as seguintes construções (Figura 1).

ORF do gene *SWA2* (SEQ ID NO: 1) codificando α -amilase (SEQ ID NO: 2) (~2 kb) foi amplificado pelo PCR, com o uso de iniciadores de *SWA1* (TAG TCG CA TAT GAG ATT TTC AAC TGA AGG), *SWA2* (SEQ ID NO: 1) (CTA TTG ATT GCA GAT GCC AGA TCC C) e DNA genômico de *Scw. occidentalis* NRRL Y-247 como modelo. O sítio de restrição *Nde* I foi incorporado no iniciador *SWA1*. 5'-terminação do produto PCR foi digerido com *Nde* I, em que o 3'-terminação foi inadequado. O produto foi inserido no plasmídeo *pK08-GAPpr* (Figura 2). ORF do gene *SWA2* (SEQ ID NO: 1) foi posto sob o *HpGAPpr* e fundido com o terminador *HpAOX* (*HpAOXtr*). O plasmídeo construído *pK08-GAPpr_SWA2* (SEQ ID NO: 1) foi utilizado como modelo para amplificação por PCR do fragmento de DNA que contém *HpGAPpt+SWA2_ORF+HpAOXtr* utilizando iniciadores K43 (CCG GAT CCC AAT TAT CAT TAA TAA TC), Ko51 (CGC GGA TCC AAT CTT GCC TTT AAA ATG). O produto resultante de PCR foi digerido com endonuclease de restrição *Bam* HI e inserido no sítio *Bam* HI do plasmídeo *pGAM1*. O plasmídeo construído foi nomeado *pGAM1SWA2* (Figura 1). O gene *Saccharomyces cerevisiae LEU2* (marcador de seleção) foi inserido no sítio de restrição *Pst* I do plasmídeo

pGAM1SWA2 e o construto resultante foi nomeado pOR1 (Figura 1).

[042]O gene aminoglicosídeo 3 -fosfotransferase (*APH*) que confere resistência ao G418 em leveduras foi isolado do plasmídeo pGLG61 após a sua digestão pela endonuclease de restrição *Pst* I. O fragmento de pGLG61 [30] *Pst* I que contém o gene foi ligado com a porção *Pst* I do plasmídeo pOR1 que carrega os genes recombinantes *GAM1* (SEQ ID NO: 3), *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e parte de bactéria, mas sem o gene *S. cerevisiae* *LEU2*. O plasmídeo resultante foi nomeado pOR11 (Figura 1).

[043]A sequência dos construtos recombinantes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) para expressão em *H. polymorpha* é apresentada nas Figuras 20 e 21 respectivamente.

Construção de plasmídeos que carregam os genes de endoxilanase e β -xilosidase de *T. reesei* e *A. niger*, respectivamente.

[044]O gene *xlnD* que codifica para β -xilosidase (SEQ. ID NO 6) foi derivado do fungo *A. niger*. ORF do gene *xlnD* junto com o terminador nativo (~2,79 kb) foi isolado do DNA genômico da cepa NRRL 3 *A. niger* utilizando iniciadores Ko46 (TGC TCT AGA ATG GCG CAC TCA ATG TCT CG) e Ko47 (CCC GAG CTC AGC TAT GCT AGC AAG CAG C). O produto PCR foi tratado com endonucleases de restrição *Sac* I e *Xba* I (os sítios destas endonucleases flanqueiam o produto) e coloca sob o *HpGAPpr*. O construto *HpGAPpr+xlnD* foi inserido no sítio de *Sac* I do plasmídeo pUC57. O plasmídeo resultante foi nomeado pxlnD e utilizado como vetor para as seguintes construções (Figura 3).

[045]ORF do gene *XYN2* que codifica endoxilanase (~0,67 kb) sem região de íntrons foi amplificado pelo PCR, com o uso de iniciadores TR1 (TTC TCA CAT ATG GTT GCC TTT TCC AGC CCT CAT CTG CGC), TR2 (CTA GTT GCT GAC ACT CTG TGA GGC AGA ACC

ACT ACC ACC), TR_{ir} (GAG CCG CCA AAG TTG ATG GGA GCA GAA GAT CCA GTC GTC), TR_{if} (GAC GAC TGG ATC TTC TGC TCC CAT CAA CTT TGG CGG CTC) e DNA genômico de *T. reseei* NRRL 11460 como modelo. 5'-terminação do produto PCR foi digerido com *Nde* I, em que o 3'-terminação foi inadequado. O produto foi inserido no plasmídeo pK08-GAPpr (Figura 2). ORF do gene XYN2 foi colocado sob *HpGA-Ppr* e terminado pelo *HpAOXtr*. O plasmídeo resultante pK08-GAPpr_XYN2 (Figura 2) foi utilizado como modelo de amplificação pelo PCR do fragmento de DNA que contém *HpGA-Ppr*+ORF_XYN2+*HpAOXtr* que usam iniciadores K43 (CCG GAT CCC AAT TAT CAT TAA TAA TC), Ko50 (GGA AGA TCT AAT CTT GCC TTT AAA ATG). O produto resultante PCR foi digerido com endonucleases de restrição *Bam* HI e *Bgl* II e inserido no sítio *Bam* HI do plasmídeo p_{xl}nD. O plasmídeo construído foi nomeado p_{xl}nDXYN2 (Figura 3).

[046]O gene *S. cerevisiae* *LEU2* foi inserido no sítio do *Pst* I plasmídeo p_{xl}nD XYN2 e o plasmídeo final foi designado como pOR2 (Figura 3).

[047]A sequência dos construtos recombinantes *XyID* e *XYL2* para expressão em *H. polymorpha* são apresentados nas Figuras 22 e 23 respectivamente.

Triagem para atividade de amilase.

[048]As cepas recombinantes obtidas após as transformações com plasmídeos que carregam genes de α -amilase (SEQ ID NO: 2) e glucoamilase (SEQ ID NO:4) foram triados por atividade amilolítica após plaqueamento em meio mínimo que contém 2% de amido solúvel (Sigma) como fonte de carbono. As placas foram incubadas a 37°C por dois dias seguidos após serem mantidas a 4°C durante a noite. Clones amilolíticos foram detectados por halos claros em torno de colônias [4, 16].

Triagem para atividade de endoxilanase (SEQ ID NO: 8)

[049] Transformantes correspondentes foram triados pela habilidade de degradação de xilana após serem plaqueados em meio mínimo que contém 0,2% de 4-Ometil-D-glucurono-D-xilana-remazol azul brilhante R (RBB)-xilana (Sigma) e 2% glicose como fonte de carbono. As placas foram incubadas a 37°C por três a quatro dias. A endoxilanase cliva a RBB-xilana em um produto incolor que forma halos claros em torno das colônias [11, 20].

Triagem para atividade de β -xilosidase (SEQ. ID NO 6)

[050] Os transformantes correspondentes foram triados pela atividade de β -xilosidase após serem plaqueados em meio mínimo que contém 1 mM de p-nitrofenil- β -D-xilosídeo (PNPX) e 2% de glicose como uma fonte de carbono. As placas foram incubadas a 37°C por uma a três horas. A atividade enzimática foi detectada pela produção de halos amarelos em torno das colônias [19].

Ensaaios de atividade de α -amilase (SEQ ID NO: 2) e glucoamilase (SEQ ID NO:4)

[051] Diluições apropriadas da cultura sem células foram utilizadas para ensaios enzimáticos.

[052] A atividade de amilase total foi medida com o uso do método de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Uma alíquota de 50 μ l de cultura sobrenadante foi incubada com 200 μ l de 0,4M tampão de acetato de sódio (pH 5,0) que contém 2% amido solúvel por trinta minutos a 50 °C. A mistura foi fervida por dez minutos até parar a reação. Uma unidade de atividade de α -amilase (SEQ ID NO: 2) foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar μ mol de redução de açúcar por ml por minuto sob as mesmas condições de cultura [17, 22].

[053] No ensaio da atividade de glucoamilase, após

manter 0,9 ml da solução de amido fervida no tampão de acetato de sódio (pH 5,5) a 30°C por cinco minutos, 0,1 ml da amostra foi adicionada e a mistura foi incubada por quinze minutos. A reação foi então interrompida ao ferver a mistura de reação por dez minutos, e a concentração de glicose produzida foi determinada com o uso do kit de ensaio "Diaglu" (UBT, Lviv, Ucrânia) [9]. A atividade de α -amilase (SEQ ID NO: 2) foi calculada pela subtração da atividade de glucoamilase da atividade total de amilase. Uma unidade de atividade de glucoamilase foi definida como a quantidade requerida de enzima para liberar 1 μ mol de glicose por minuto do substrato [28].

Ensaio da atividade de β -xilosidase e endoxilanase

[054]As culturas produtoras de enzimas foram cultivadas em 3 ml YPD durante a noite. As células foram coletadas por centrifugação e sobrenadante foi utilizado para medir a atividade das enzimas.

[055]A atividade de endo- β -1,4-xilanase foi ensaiada pelo método descrito por Bailey et al. [1] com 1% de xilana de madeira de vidoeiro (Fluka) como substrato a 50°C. As diluições apropriadas da solução de cultura sem células a 50 mM de tampão de citrato de sódio (pH 5,0) foram utilizadas como fonte de enzima. A quantidade de açúcar liberado foi determinada pelo método de ácido dinitrossalicílico [20]. A atividade de β -xilosidase (SEQ. ID NO 6) foi quantificada pelo uso de substrato cromofórico PNPX a uma concentração de 5 mM. O sobrenadante foi utilizado como fonte de β -xilosidase para ensaios de determinação de atividade. Todas as atividades foram expressas em kat/ml; um katal é a quantidade de enzimas necessárias para produzir 1 mol de redução de açúcar de xilana de madeira de vidoeiro ou substrato cromofórico por segundo [19].

Ensaio de produção de etanol.

[056] Para uma produção de etanol, os transformantes *H. polymorpha* foram cultivados durante quatro dias em meio mínimo líquido que contém 3% de amido solúvel ou 3% xilana de madeira de vidoeiro a 48°C, em condições semi-aeróbicas. As concentrações de etanol no meio foram determinadas após cada 24 horas utilizando o kit "Alcotest" [10].

Efeitos do pH e aeração na efetividade da fermentação de amido em etanol.

[057] As condições ótimas para a fermentação direta de amido em etanol por transformantes isolados foram estudadas. As cepas de levedura foram pré-culturadas a 48°C em 50 ml de meio YPD em frascos 125 ml Erlenmeyer por 48 horas com agitação estabelecidas a 220 rpm no agitador Inkubator 1000 Heidolph (Schwabach, Alemanha). As células foram inoculadas em concentração de 2 mg/ml em 50 ml de meio mínimo que contém 3% de amido de batata solúvel como única fonte de carbono.

[058] O efeito do pH do meio numa produção de etanol durante a fermentação de amido foi investigado. O ótimo pH para α -amilase (SEQ ID NO: 2) é ~ 6,0 e para glucoamilase é de 5,2 a 5,5. A fermentação foi feita utilizando o meio com pH 5,5 e 6,0. Um tampão de 1 M de fosfato de potássio foi utilizado ajustando-se o pH médio. A produção de etanol ficou no meio com pH 5.5 (Figura 4 A & B).

[059] O efeito de aeração na eficiência de fermentação foi estudado. As taxas de rotação de 120 a 180 rpm foram testados. A produção de etanol mais alta foi no caso de rotação de 135 rpm.

Efeitos de pH, a aeração e concentração de substrato na efetividade de fermentação de xilana para etanol.

[060]As condições ótimas para a fermentação de xilana de madeira de vidoeiro para etanol por transformantes isolados foram estudados. As cepas de levedura foram pré-cultivadas a 48°C em 50 ml de meio YPD em frascos de 125 ml Erlenmeyer por 48 horas com agitação estabelecida a 220 rpm. As células foram removidas pela centrifugação a 4.000 rpm por cinco minutos, lavadas e inoculadas (em concentração de 2 mg/ml) em 50 ml de meio mínimo que contém 3% ou 9% de xilana de madeira de vidoeiro e 0,05% de glicose como fontes de carbono.

[061]O efeito do pH do meio na produção de etanol durante a fermentação de xilana foi investigado. A fermentação foi executada utilizando-se o meio com pH 4,5 e 5,8. Um tampão de solução de fosfato de potássio 1M foi utilizado para ajustar o pH médio com concentração final de 0,1M no meio. A melhor produção de etanol foi atingida no meio com pH 5,8 (Figura 5A).

[062]O efeito da aeração sobre a eficácia da fermentação foi estudado. As taxas de rotação de 120 a 180 rpm foram testadas. A produção de etanol mais alta no caso de 120 rpm (Figura 5B). A concentração mais alta de xilana (9%) resultou em uma melhor produção de etanol (Figura 5).

Hibridização em transferência Southern

[063]A rotulação de sonda de DNA e hibridização foi desempenhada pelo uso de Rotulação de Ácido Nucléico Direto e Sistema de Detecção Amersham ECL não radioativo (GE Healthcare, E.U.A.), de acordo com o manual do fabricante. Para a transferência de pontos Southern quantitativa, o preparado de diluições em série de genômicos de DNA de levedura foi desnaturado em 0,4 M de NaOH, manchado sobre membrana de náilon (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech) e rotulado com fragmentos de DNA apropriados, seguidos por visualização com o kit de detecção

Amersham ECL tal como descrito acima. O *HpGAPpr* foi utilizado como sonda.

Eletroforese em Gel.

[064]O SDS-PAGE foi executado pelo método de Laemmli [19]. As proteínas concentradas do extrato sem células foram visualizadas pela coloração Silver e coloridas com azul brilhante Coomassie. A concentração em gel fracionador e de empilhamento é 12% e 5% de poliacrilamida, respectivamente. 20 µl de solução Laemmli adicionada a 20 µl de mostra e 35 µl de mistura foram injetados ao gel fracionador [31].

Expressão Resultante de genes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) de *Scw occidentalis* em *H. polymorpha*.

[065]A cepa de *H. polymorpha* 495 2Eth-*leu1-1* foi utilizada como recipiente para transformação pelo plasmídeo *Sph I* linearizado *pOR1* (esquema de plasmídeo é apresentado na Figura 1). Depois que as células de transformação foram plaqueadas com um meio mínimo suplementado com 2% de glicose e 1% de amido solúvel. Entre ~ 140 transformantes os 14 que formaram os maiores halos claros amilolíticos foram os escolhidos. A presença de genes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) sob *HpGAPpr* nestes transformantes foram apresentados por PCR utilizando iniciadores correspondentes (Figura 6). Os transformantes conseguiram crescer em amido solúvel e fermentar o substrato em etanol a 37 e 48°C. A secreção eficiente das amilases com os integrantes foram apresentados pela formação de halos claros em torno das colônias (Figura 7 A & B). O melhor integrante selecionado (2Eth- *leu1*/pOR1 # 7) produziu acima de 3 g/l etanol após 48 horas de fermentação em um meio mínimo com 3% de amido solúvel a um pH 5,5, a 48°C (Figura 8). Para obter cepas de *H. polymorpha* com atividade amilolítica tentamos aumentar os núme-

ros de cópias de *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3). Com este objetivo, o plasmídeo pOR1 l (Figura 3) levando o marcador dominante (gene APH que confere resistência para G418) e genes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) foram utilizados. A cepa *H. polymorpha* 495 2Eth- *leu1* foi utilizada como recipiente para transformação pelo plasmídeo linearizado *Sph I* pOR1 l. Após a transformação, as células foram plaqueadas em um meio YPD com 0,2 g/l G418. Cinco transformantes estáveis foram encontrados e retirados entre ~ 80 resultando colônias resistentes a G418. A presença de genes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) sob o *HpGAPpr* nestes transformantes foi mostrada em um meio por PCR utilizando iniciadores correspondentes (Figura 6). A produção de enzimas recombinantes (α - e glucoamilase) por estas cepas foi demonstrada pela SDS-PAGE (Figuras 9 A e B).

[066] Isolados acompanhando a transformação com o plasmídeo pOR1 l formaram halos claros amilolíticos maiores em relação aos melhores transformantes isolados previamente do plasmídeo pOR1 (Figura 10). A hibridização Southern demonstrou a presença de aproximadamente seis a oito cópias dos genes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) nos transformantes isolados (Figura 11).

[067] Os transformantes 495 2Eth- *leu1-1*/pOR11 mostraram uma atividade mais alta tanto do α - quanto do glucoamilase quando comparados com as cepas que contêm apenas três a quatro cópias dos genes de amilase (Figuras 12 A e B).

[068] A eficácia da fermentação de amido alcoólico de transformantes isolados foi estudada. Estes transformantes apresentaram uma elevada produção de etanol (6,5 g/l após 72 horas de cultivo) quando comparados com os transformantes isolados previamente pela transformação pOR1. A fermentação foi

executada em um meio YNB mínimo com 3% de amido solúvel a pH 5,5, 48 °C, 135 rpm (Figura 13).

Isolamento das cepas de *H. polymorpha* com propriedades melhoradas de fermentação de amido.

[069]O plasmídeo ploxZeoloxPDC1Hp construído previamente em laboratório [14], foi utilizado para obter cepas de *H. polymorpha* com propriedades amilolíticas melhoradas. Seguindo a expressão excessiva do gene de piruvato descarboxilase (PDC1), estas cepas foram caracterizadas por uma produção de etanol melhorada quando comparadas à cepa de controle 495 2Eth⁻ [14]. O plasmídeo ploxZeoloxPDC1Hp que contém o gene PDC1 conduzido com o *HpGAPpr* foi linearizado pelo BamHI e utilizado para a transformação da cepa #4', isolada previamente (495 2Eth⁻/pOR1). Os transformantes resistentes a zeocina foram selecionados em um meio YPD suplementada com 150 µg/ml de zeocina. Alguns destes integrantes estáveis foram selecionados para futuros estudos. A efetividade da fermentação alcoólica destes recombinantes foi estudada. Todos os transformantes apresentaram níveis mais altos da produção de etanol (7 a 8 g/l) comparados com a cepa 4' (acima de 4 g/l; Figura 14).

[070]A cepa #6 (o transformante 4'/ploxZeoloxPDC1Hp, que apresentou o nível mais alto da produção de etanol) foi utilizado como recipiente para a transformação com o plasmídeo pOR1 linearizado com *Sph I*. Os transformantes Leu⁺ foram selecionados em um meio mínimo sem leucina e estabilizados. Os transformantes estáveis foram plaqueados em um meio mínimo suplementada com 2% amido solúvel. Alguns dos integrantes, que formaram halos claros maiores em comparação com a cepa #6, foram selecionados para estudos futuros (Figura 15). A efetividade de fermentação alcoólica desses recombinantes foi estudada. Todos os

transformantes mostraram níveis mais altos da produção de etanol (9 - 10 g/l) quando comparados com a cepa #6 (Figura 16).

Expressão dos genes *T.reesei* XYN2 e *A. niger* XLND em *H. polymorpha*.

[071]O plasmídeo pOR2 que contém os genes *T. reesei* XYN2 e *A. niger xlnD* conduzidos com o *HpGAPpr* (Figura 3) foi linearizado por *SphI* e utilizados para transformação da cepa *H. polymorpha* 495 2Eth-leul-1. Os transformantes Leu⁺ foram estabilizados. A presença dos genes XYN2 e *xlnD* sob o *HpGAPpr* em transformantes foi testada por PCR utilizando os iniciadores correspondentes (Figura 6).

[072]Os transformantes conseguiram crescer em xilana como única fonte de carbono (Figuras 17, A, B1 e B2). A secreção eficiente de endoxilanase (SEQ ID NO: 8) e β -xilosidase (SEQ. ID NO 6) com os integrantes foi apresentada pela formação de halos claros ou amarelos em meio que contém 0,2% RBB-xilana ou IMM PNPX, respectivamente (Figura 18 A e B). A atividade de ambas as enzimas foi medida (Figura 19 A e B). Os transformantes conseguiram fermentar xilana de madeira de vidoeiro em etanol com baixa eficiência (aproximadamente 0,35 g/l) em ambos a 37 e 48°C.

Co-expressão de *T.reesei* XYN2, *A. niger* XLND, com genes *Scw. occidentalis* SWA2 (SEQ ID NO: 1) e GAM1 (SEQ ID NO: 3) em *H. polymorpha*.

[073]Em um primeiro caso, os transformantes 495 2Eth-leul-1/pOR11 que contêm ambos os genes α -amilase (SEQ ID NO: 2) e glucoamilase de *Scw. occidentalis* integrados ao cromossomo de *H. polymorpha* são utilizados na cepa hospedeira. O plasmídeo pOR2 que contém os genes *T. reesei* XYN2 e *A.niger xlnD* conduzidos com o *HpGAPpr* é linearizado pelo *SphI* e utilizado para a

transformação da cepa *H. polymorpha* 495 2*Eth-leu1-1*/pOR11. Os transformantes são estabilizados como antes. A presença dos genes *XYN2* e *xlnD* é testada por meio de PCR utilizando os iniciadores correspondentes. Os transformantes serão podem ser cultivados com amido solúvel e/ou xilana solúvel como única fonte de carbono. A secreção eficiente das quatro enzimas será demonstrada essencialmente tal como foi descrito acima. Os transformantes podem fermentar em um meio misturado que contém tanto o amido solúvel quanto xilana de madeira de vidoeiro em etanol tanto a 37 quanto a 48°.

[074]Em um segundo caso, o transformante descrito acima, tendo ambos os genes α -amilase (SEQ ID NO: 2) e glucoamilase já transformados na cepa, A'/ploxZeoloxPDClHp, que expressa excessivamente o gene PDC é utilizado como cepa hospedeira. Novamente, o plasmídeo pOR2 que contém os genes *T. reesei* *XYN2* e *A.niger* *xlnD* conduzidos com o *HpGAPpr* é linearizado pelo SphI e utilizado para transformação da cepa hospedeira *H. polymorpha*. Os transformantes são estabilizados como antes. A presença dos genes *XYN2* e *xlnD* é testada por PCR utilizando iniciadores correspondentes. Os transformantes serão podem ser cultivados com amido solúvel e/ou xilana solúvel como única fonte de carbono. A secreção eficiente das quatro enzimas será demonstrada essencialmente tal como descrito acima. Os transformantes podem fermentar um meio misturado que contém tanto o amido solúvel quanto xilana de madeira de vidoeiro em etanol a ambos 37 e 48° em um nível mais alto do que os transformantes fizeram no primeiro caso devido à expressão excessiva complementar da enzima PDC na célula hospedeira.

DISCUSSÃO

[075]A produção de etanol para combustível de materi-

al de planta renovável tem grande significado econômico e ecológico. Um dos subprodutos da indústria de fresagem a úmido de milho que já está disponível em grandes quantidades é a fração de casca de fibra de milho. Esta fração é misturada e secada com outros subprodutos processantes e fração de destilamento de fermentação de etanol para produzir alimento de glúten de milho. As cascas de fibra de milho consistem de 35% hemicelulose, 18% celulose e 20% amido (proteína, olho de fibra e lignina estão presentes também neste material) [7], a xilana é o maior componente da hemicelulose. Os estágios industriais que incluem hidrólise enzimática de xilana e amido são demasiado caros. Por isso a conversão microbial direta destes polímeros em etanol é de grande significância Econômica. Por esta razão, o desenvolvimento de micro-organismos podem realizar hidrólise simultânea de amido e xilana e fermentação dos açúcares liberados em etanol a temperaturas elevadas é de grande importância para a produção de combustível de etanol do milho. A glicose e a xilose são os principais açúcares liberados após hidrólise de amido e xilana, respectivamente. A levedura *H. polymorpha* fermenta a glicose e a xilose em etanol a temperaturas elevadas. No entanto, a *H. polymorpha* não pode utilizar materiais de amido e xilana e cultivar neles como única fonte de carbonos.

[076]Foram clonados dois genes da levedura *Scw. occidentalis* *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) que codificam a α -amilase (SEQ ID NO: 2) e glucoamilase (SEQ ID NO:4), respectivamente. Ambas estas enzimas são necessárias para hidrólise de amido. Os genes *SWA2* (SEQ ID NO: 1) e *GAM1* (SEQ ID NO: 3) foram expressos com sucesso na *H. polymorpha*. Cepas recombinantes isoladas são podem ser cultivadas em amido como única fonte de carbono. São também podem fermentar amido solú-

vel em etanol a 48 °C. Nós mostramos que números de cópias crescentes de genes aumentam a capacidade das cepas recombinantes para a hidrólise de amido e produção de etanol.

[077]Os genes de *T. reesei* XYN2 e *A. niger* xlnD que codificam a endoxilanase e β -xilosidase, respectivamente, foram clonados e expressados em *H. polymorpha*. Pelo menos duas destas enzimas são necessárias para a hidrólise de xilana. Integrantes isolados conseguiram crescer com a xilana como única fonte de carbono e fermentá-la em etanol a ambos 37 e 48 °C. A baixa efetividade da conversão de xilana em etanol por cepas isoladas é mais provável devido à capacidade inicial baixa de cepas de *H. polymorpha* na fermentação alcoólica de xilose. As melhorias futuras na fermentação de xilana pelas cepas construídas exigirão uma fermentação etanólica de xilose como pré-requisito. Estas cepas poderão então ser utilizadas como recipientes para construção de recombinantes efetivos xilanolíticos.

REFERÊNCIAS

1. Bailey, M. J., P. Biely e K. Poutanen. 1992. Inter laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. 23:257 a 270.
2. Banat, I.M., P. Nigam, D. Singh, P. Marchant e A.P. McHale. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part I: yeasts in general. World J Microbiol Biotechnol. 14:809 a 821.
3. Dmytruk, O. V., A. Y. Voronovsky, C. A. Abbas, K. V. Dmytruk, O. P. Ishchuk e A. A. Sibirny. 2008. Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res. 8:165 a 173.
4. Eksteen, J.M., P. van Rensburg, R.R. Cordero Otero

e LS. Pretorius. 2003. Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the α -amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. Biotechnol. Bioengineer. 84:639 a 646.

5. Faber, KN, P. Haima, W. Harder, M. Veenhuis e G. Ab. 1994. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. Curr. Genet. 25:305 a 310.

6. Fujita, Y. e J. Ito. 2004. Synergistic saccharification e direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 70:1.207 a 1.212.

7. Gaspar, M., G. Kalman e K. Reczey. 2007. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. Process Biochem. 42:1.135 a 1.139.

8. Gellissen, G., G. Kunze, C. Gaillardin, J.M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis e I. van der Klei. 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* a comparison. FEMS Yeast Res. 5:1.079 a 1096.

9. Gonchar, M. V. 1998. Sensitive method for quantitative determination of hydrogen peroxide and oxidase substrates in biological samples. Ukr. Biokhim. Zh. 70:157 a 163.

10. Gonchar, M. V., M.M. Maidan e A. A. Sibirny. 2001. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. Food Technol. Biotechnol. 39:37 a 42

11. den Haan R. e W. H. van ZyI. 2001. Differential expression of the *Trichoderma reesei* [beta]-xylanase II (xyn2) gene in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. Appl Mi-

crobiol Biotechnol. 57:521 a 527.

12. Haki, G.D. e S.K. Rakshit. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes:a review. Bioresource Technology. 89:17 a 34.

13. Ishchuk, O. P., A. Y. Voronovsky, O. V. Stasyk, G. Z. Gayda, M. V. Gonchar, C. A. Abbas e A. A. Sibirny. 2008. Improvement of xylose high-temperature fermentation in *Hansenula polymorpha* due to overexpression of the PDC1 gene coding for pyruvate decarboxylase. FEMS Yeast Res. Em imprensa.

14. Jeffries, T. W. e Y. S. Jin. 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. Adv. Appl. Microbiol. 47:221 a 268.

15. Kadam, K. L. e S. L. Schmidt. 1997. Evaluation of *Candida acidothermophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48:709 a 713.

16. Kang, N. Y., J. N. Park, J. E. Chin, H. B. Lee, S. Y. Im e S. Bai. 2003. Construction of an amylolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanomyces occidentalis* α -amylase gene. Biotechnol. Lett. 25:1.847 a 1.851.

17. Kiliç, D. e B. Özbek. 2004. α - Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis. Process Biochem. 39:1.137 a 1.144.

18. Kulkarni, N., A. Shendye e M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 23:411 a 456.

19. La Grange, D. C, I. S. Pretorius, M. Claeysens e W. H. van Zyl. 2001. Degradation of xylan to D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger* β -xylosidase (xlnD) and the *Trichoderma reesei* xylanase

II (xyn2) genes. Appl. Environ. Microbiol. 67:5.512 a 5.519.

20. La Grange, D. C, I. S. Pretorius e W. H. van ZyI. 1996. Expression of a *Trichoderma reesei* [beta]-xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 62:1.036 a 1.044.

21. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680 a 685.

22. Liu, Z., G. Zhang e S. Liu. 2004. Constructing an amylolytic brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* suitable for accelerated brewing. J. Biosci. Bioeng. 98:414 a 419.

23. Marin, D., A. Jimenez e M. Fernandez Lobato. 2001. Construction of an efficient amylolytic industrial yeast strain containing DNA exclusively derived from yeast. FEMS Microbiol. Lett. 201:249 a 253.

24. Mosier, N. e C. Wyman. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 96:673 a 686.

25. Piontek, M., J. Hagedorn, C. P. Hollenberg, G. Gellissen e A. W. M. Strasser. 1998. Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:331 a 338.

26. Ryabova, O. B., O. M.Chmil e A. A.Sibirny. 2003. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res. 4:157 a 164.

27. Sambrook, J., E. F. Fritsh e T. Maniatis. Molecular Cloning:A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

28. Shigechi, H., Y. Fujita, J. Koh, M. Uedac, H. Fu-

kuda e A. Kondo. 2004. Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and [alpha]-amylase. *Biochem. Eng. J.* 18:149 a 153.

29. Shigechi, H., J. Koh, Y. Fujita, T. Matsumoto, Y. Bito, M. Ueda, E. Satoh, H. Fukuda e A. Kondo. 2004. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and [alfa]-amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5.037 a 5.040.

30. Sohn, J. H., E. S. Choi, H. A. Kang, J. S. Rhee, M. O. Agaphonov, M. D. Ter-Avanesyan e S. K. Rhee. 1999. A dominant selection system designed for copynumber-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-I . *Appl Microbiol Biotechnol* 51:800 a 807.

31. Torronen, A., L. R. Mach, R. Massner, R. Gonzales, N. Kalkkinen, A. Harkki e C. P. Kubicek. 1992. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. *Biothechnology.* 10:1.461 a 1.465.

32. Ulgen, K. O. e B. Saygih. 2002. Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB. *Process Biochem.* 37:1.157 a 1.168.

33. de Vries, R. P. e J. Visser. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. MoI. Biol. Rev.* 65:497 a 522.

34. Wang, T. T., L. L. Lin e W. H. Hsu. 1989. Cloning and expression of a *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environment. Microbiol.* 55:3.167 a 3.172.

35. Zaldivar, J., J. Nielsen e L. Olsson. 2001. Fuel

ethanol production from lignocellulose:a challenge for metabolic engineering and process integration. Appl Microbiol Biotechnol. 56:17.

REIVINDICAÇÕES

1. CEPA *H. POLYMORPHA*, caracterizada por compreender pelo menos um gene *SWA2* que codifica uma α -amilase, de acordo com a SEQ ID NO: 2, e, pelo menos, um gene *GAM1* que codifica uma glucoamilase, de acordo com a SEQ ID NO: 4, sendo que os genes são ligados de modo operável a pelo menos um HpGAP promotor obtido de *H. polymorpha*, que expresse os ditos genes na cepa de *H. polymorpha*, e que inclui, adicionalmente, um gene *PDC1* que codifica uma piruvato descarboxilase de *H. polymorpha* ligado de modo operável a um Promotor HpGAP que expressa a dita piruvato descarboxilase na cepa de *H. polymorpha* e as ditas enzimas α -amilase e glucoamilase são secretadas em um meio de crescimento da cepa *H. polymorpha* que contém apenas amido solúvel como uma fonte de carbono a uma temperatura de 37 °C a 48 °C.

2. CEPA DE *H. POLYMORPHA*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos genes *SWA2* e *GAM1*, que codificam uma α -amilase e uma glucoamilase, respetivamente, serem integrados dentro do cromossomo de *H. polymorpha*.

3. CEPA DE *H. POLYMORPHA*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o pelo menos um gene *SWA2* ou *GAM1*, incluir, adicionalmente, um terminador ligado de modo operável ao dito gene para terminar a transcrição do gene expressado.

4. CEPA DE *H. POLYMORPHA*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender pelo menos um gene *Xyn2* que codifica uma endoxilanase, de acordo com a SEQ ID NO: 8, e, pelo menos, um gene *xn1D* que codifica uma β -xilosidase de acordo com a SEQ ID NO: 6, em que cada gene é ligado de modo operável a pelo menos um promotor que expresse os ditos genes na cepa de *H. polymorpha* e as ditas enzimas sejam secretadas em um meio de

crescimento da cepa de *H. polymorpha* que contenha apenas ou em uma única combinação, um amido solúvel e uma xilana solúvel como fonte de carbono.

5. PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DE ETANOL, caracterizado por compreender o crescimento da cepa de *H. polymorpha*, conforme definido na reivindicação 1, em um meio que compreende amido solúvel sob as condições que fazem com que a *H. polymorpha* produza etanol.

6. PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DE ETANOL, caracterizado por compreender o crescimento da cepa de *H. polymorpha*, conforme definido na reivindicação 1, em um meio que compreende amido solúvel e uma xilana solúvel sob as condições que fazem com que a *H. polymorpha* produza etanol.

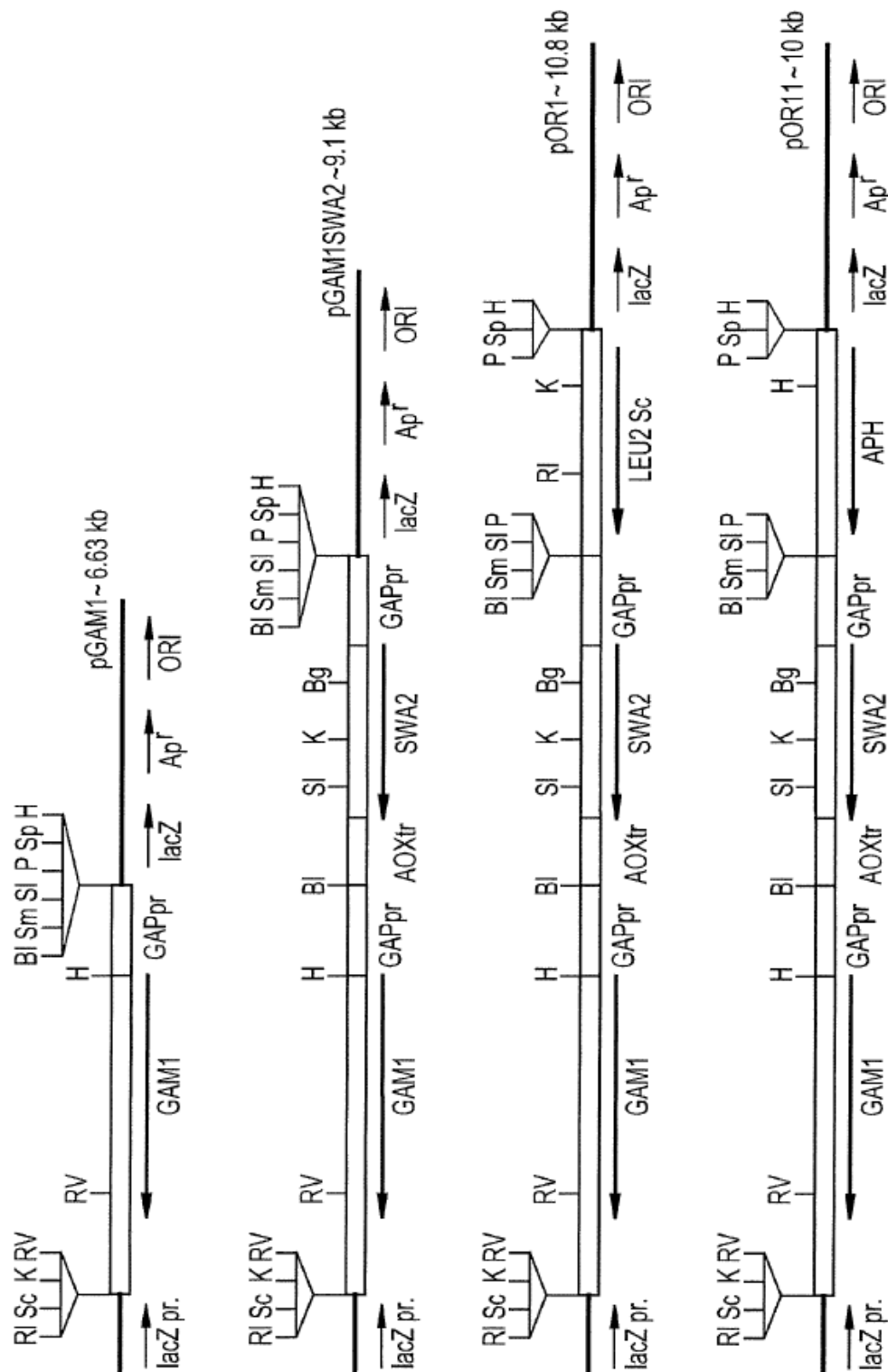


Fig. 1

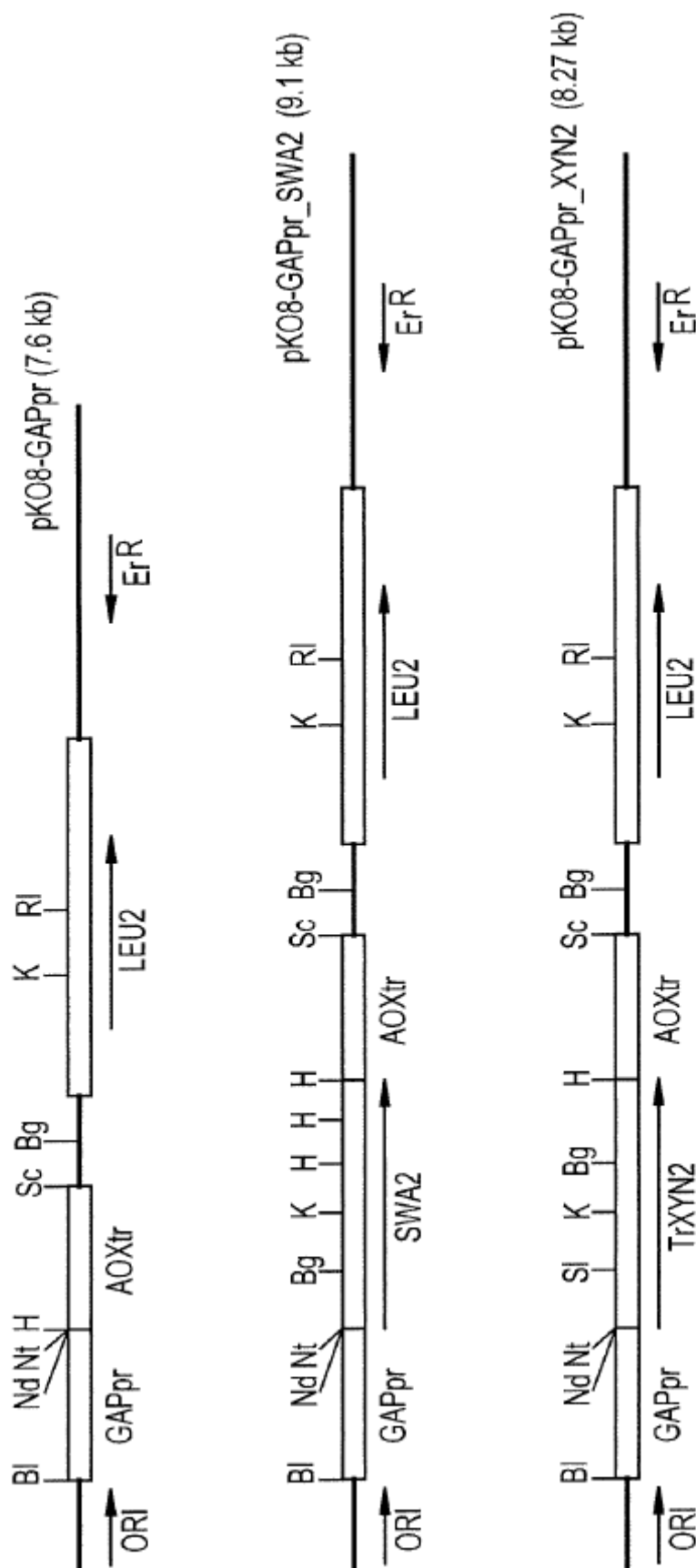


Fig. 2

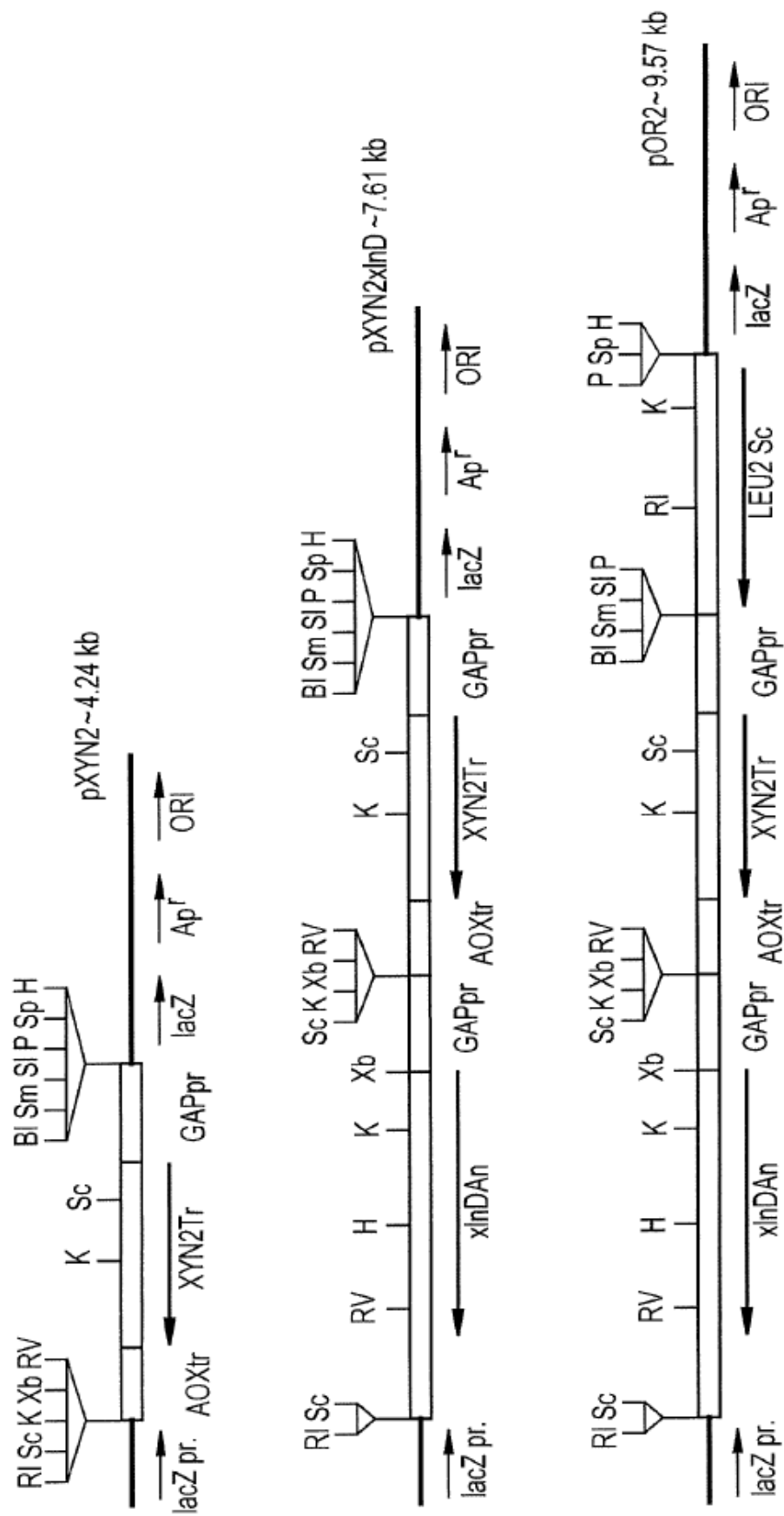


Fig. 3

4/17

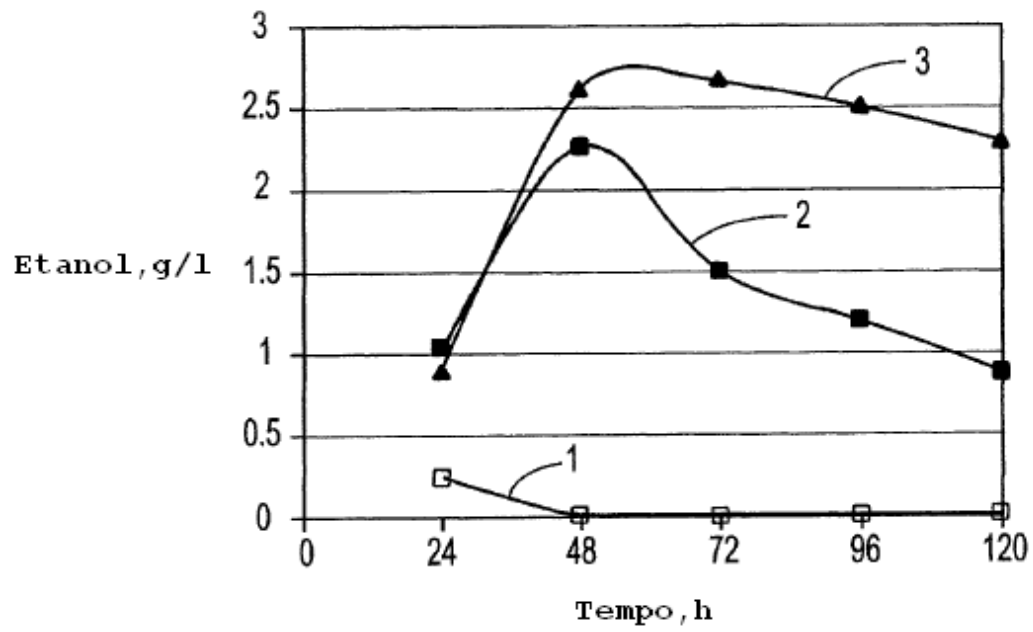


Fig. 4A

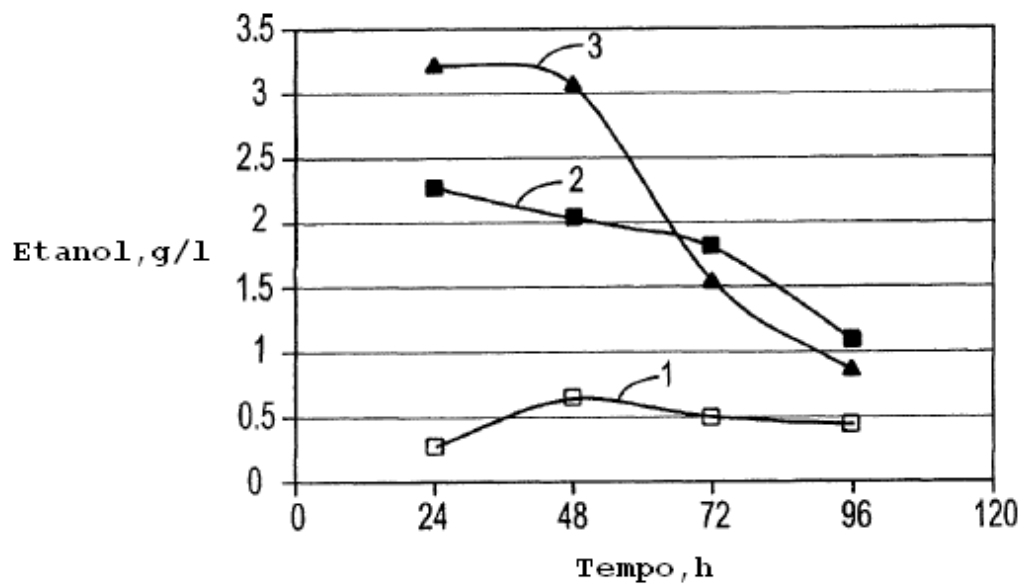


Fig. 4B

5/17

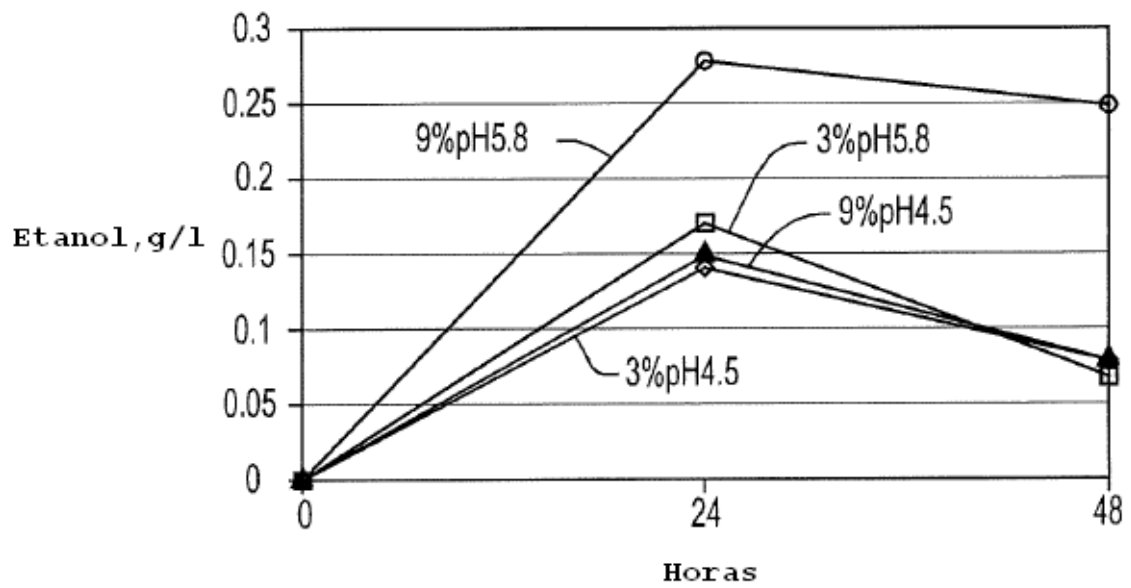


Fig. 5A

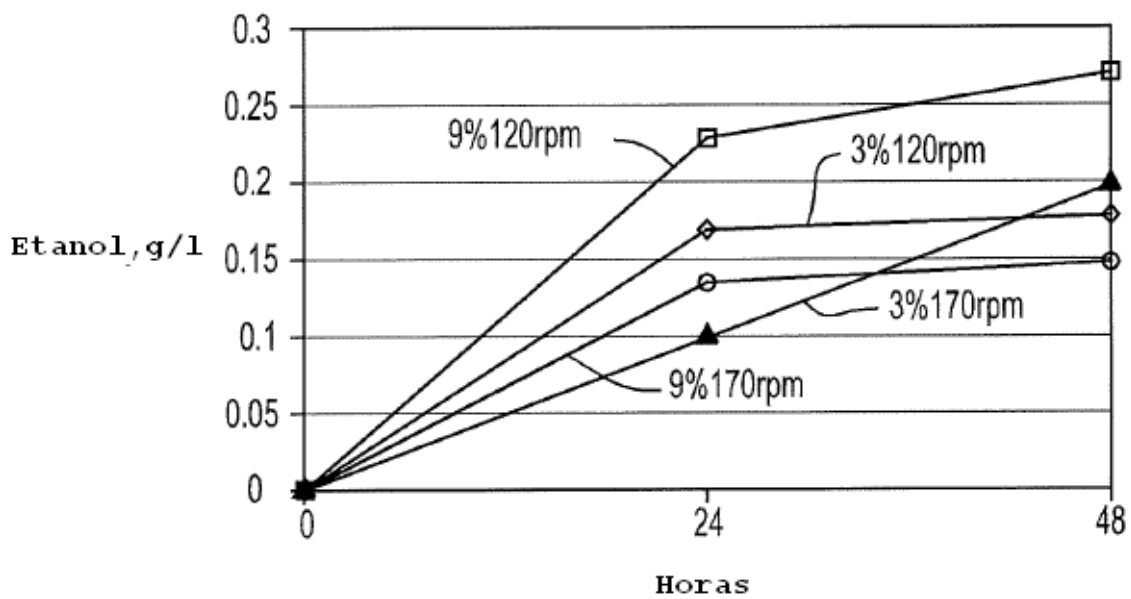


Fig. 5B

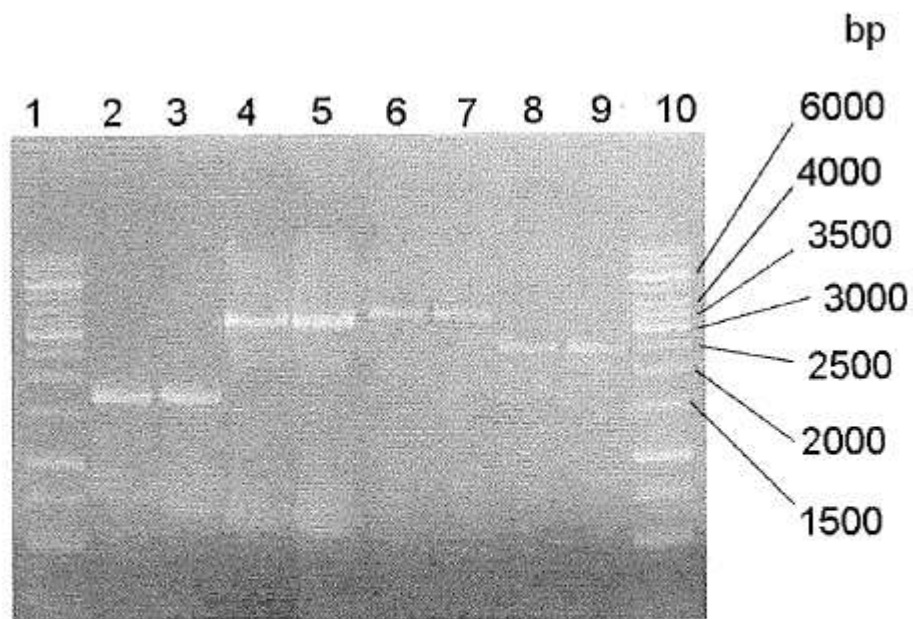


Fig. 6

7/17

meio mínimo + 2% de amido

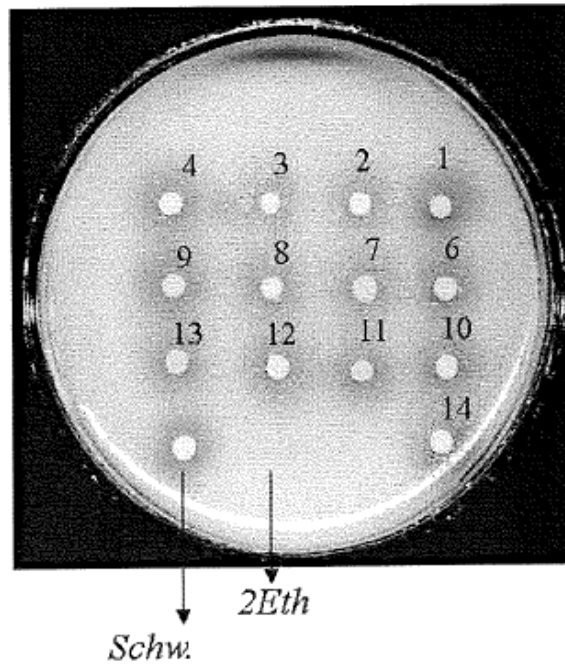


FIG. 7A

meio mínimo + 2% de amido + 1% de glicose

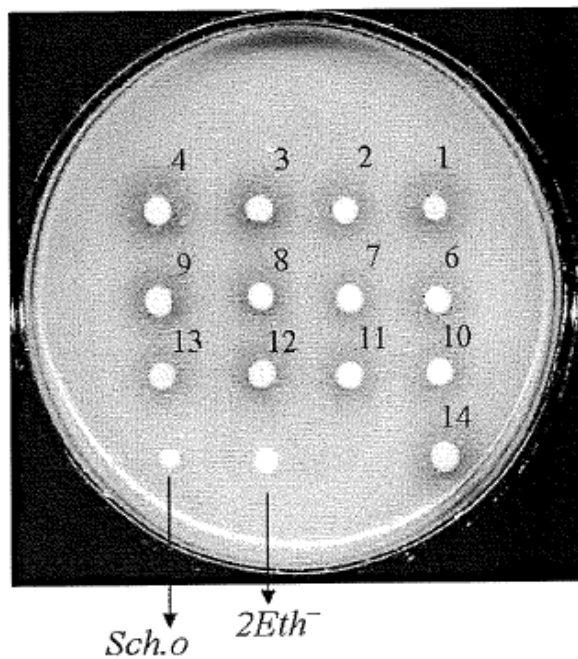


FIG. 7B

8/17

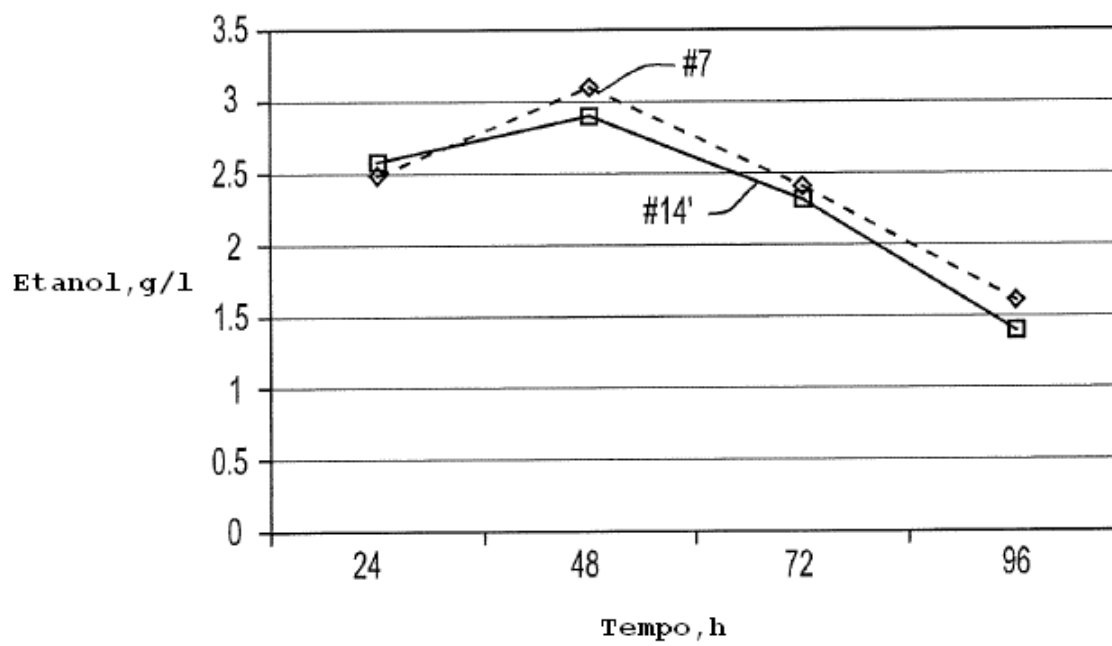


Fig. 8

9/17

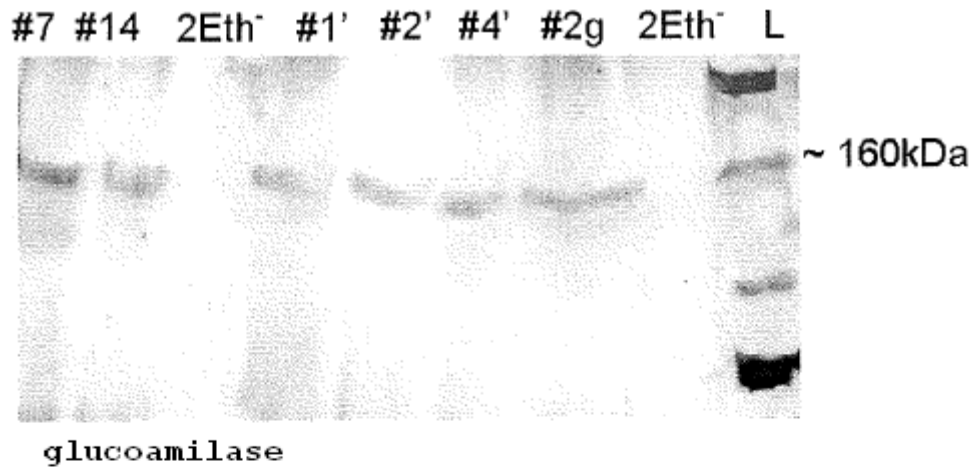


Fig. 9A

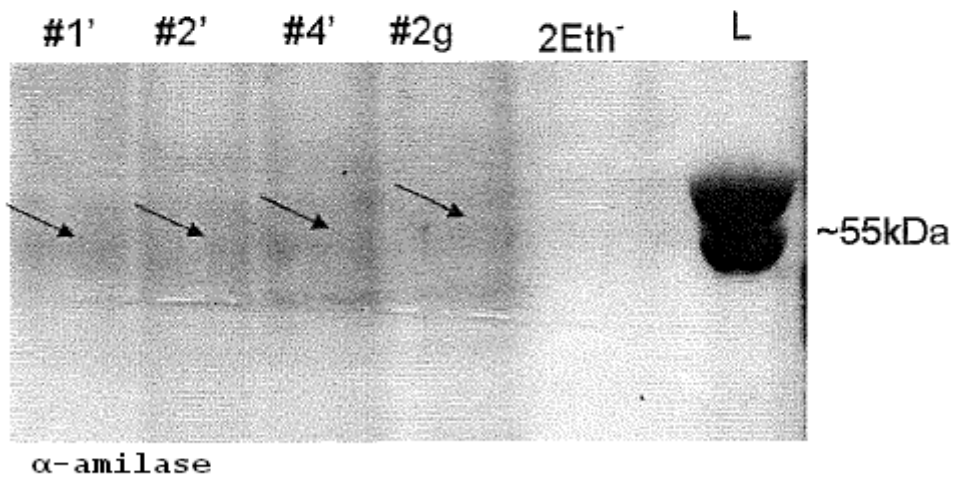


Fig. 9B

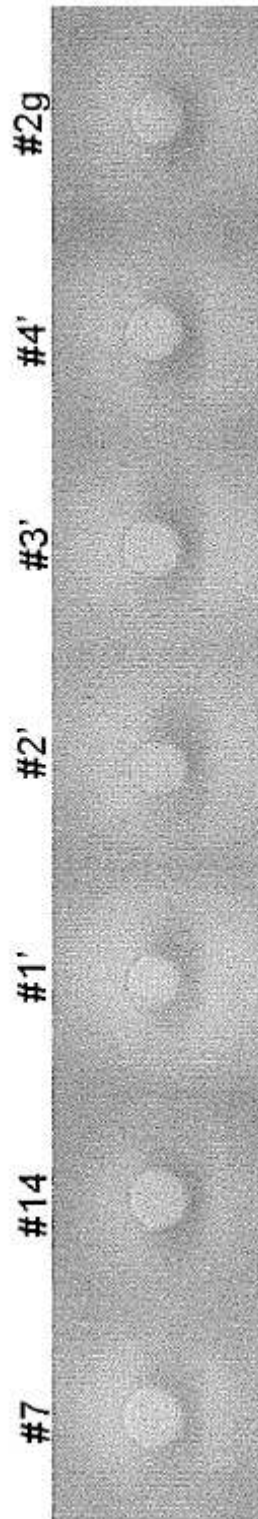


Fig. 10

11/17

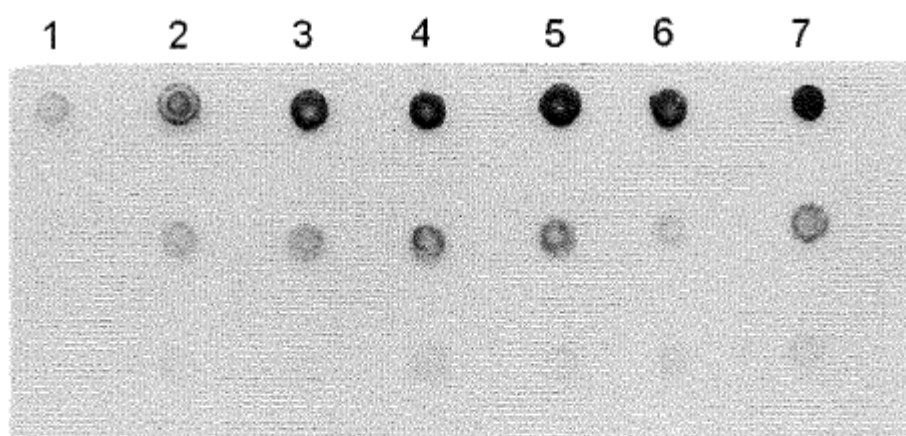


Fig. 11

12/17

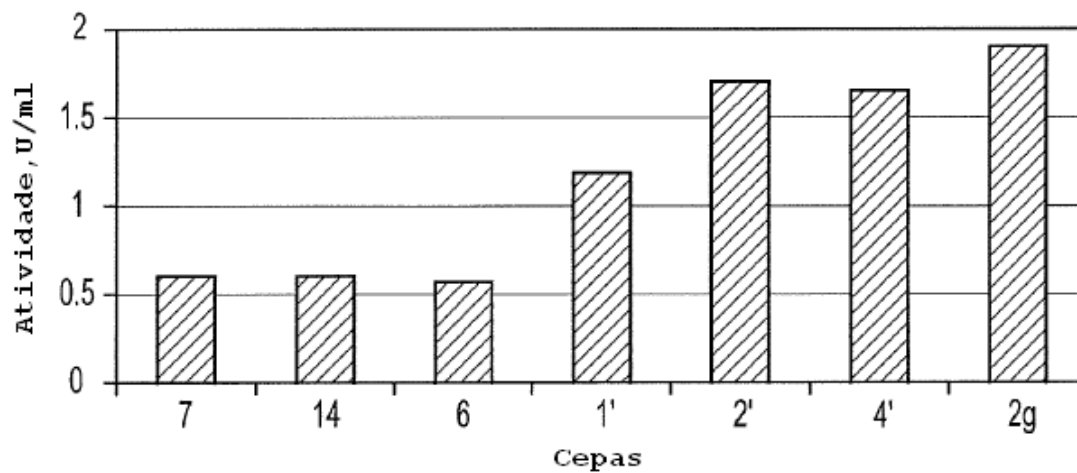


Fig. 12A

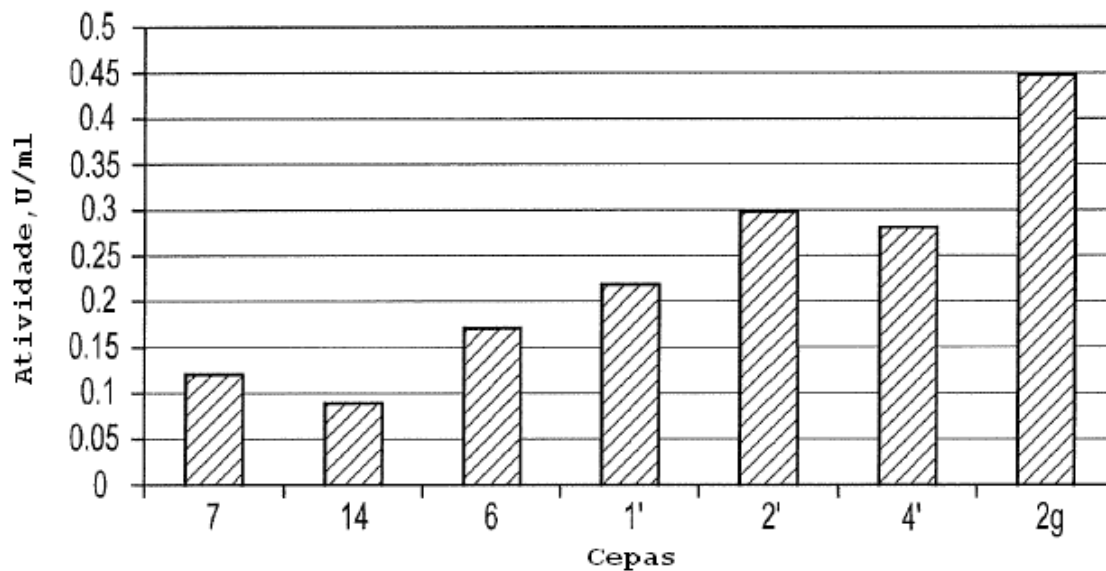


Fig. 12B

13/17

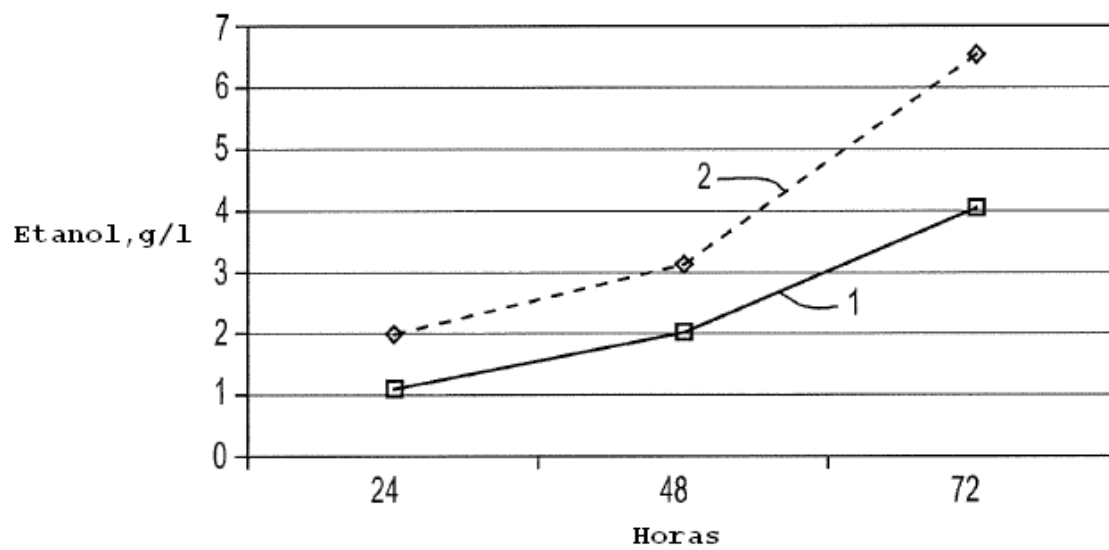


Fig. 13

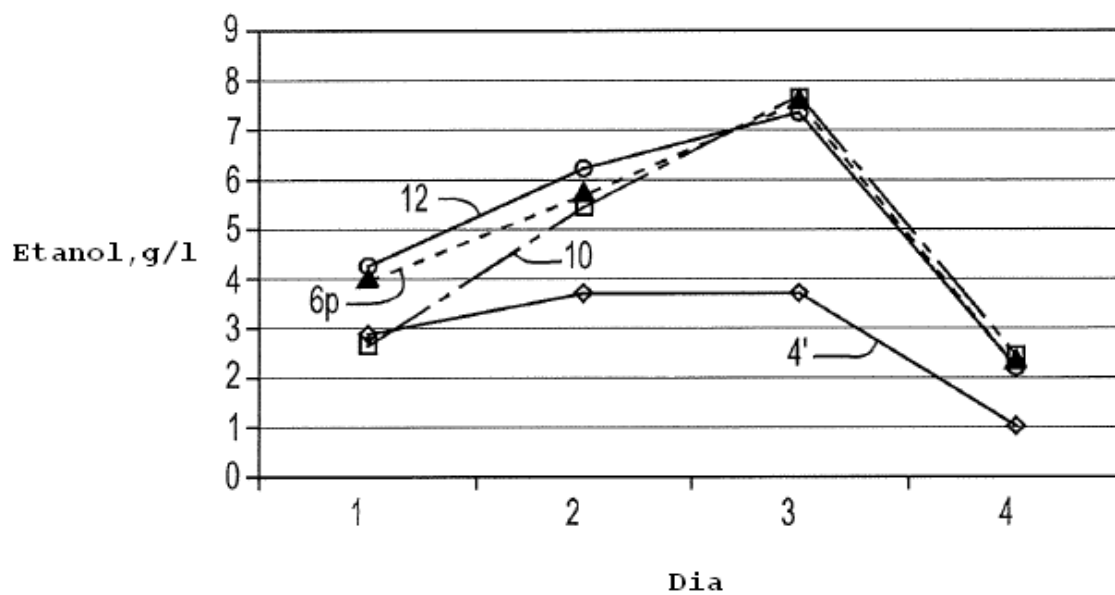


Fig. 14

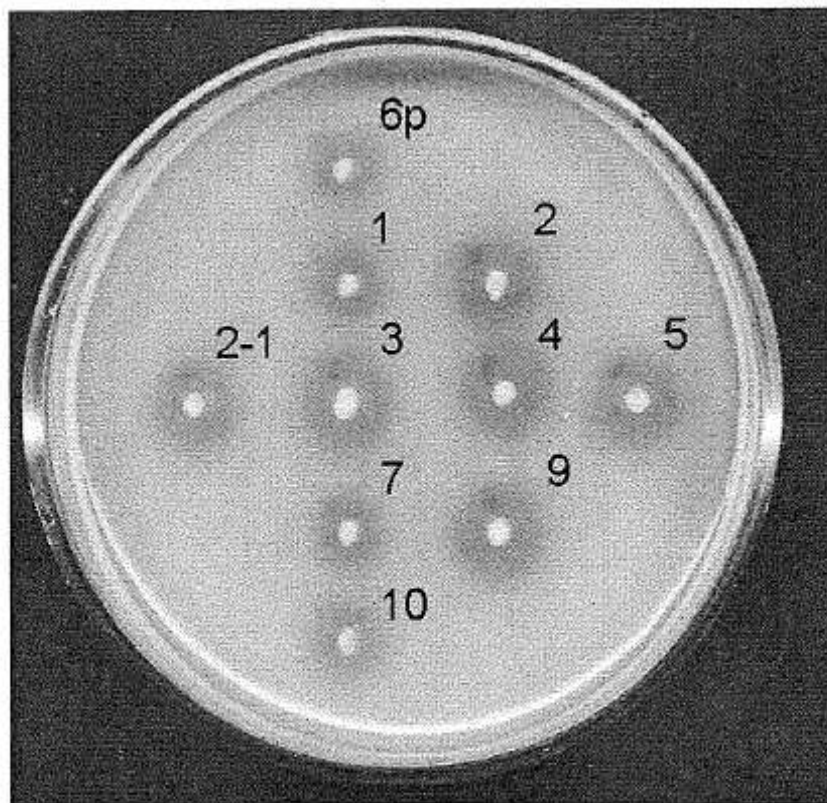


Fig. 15

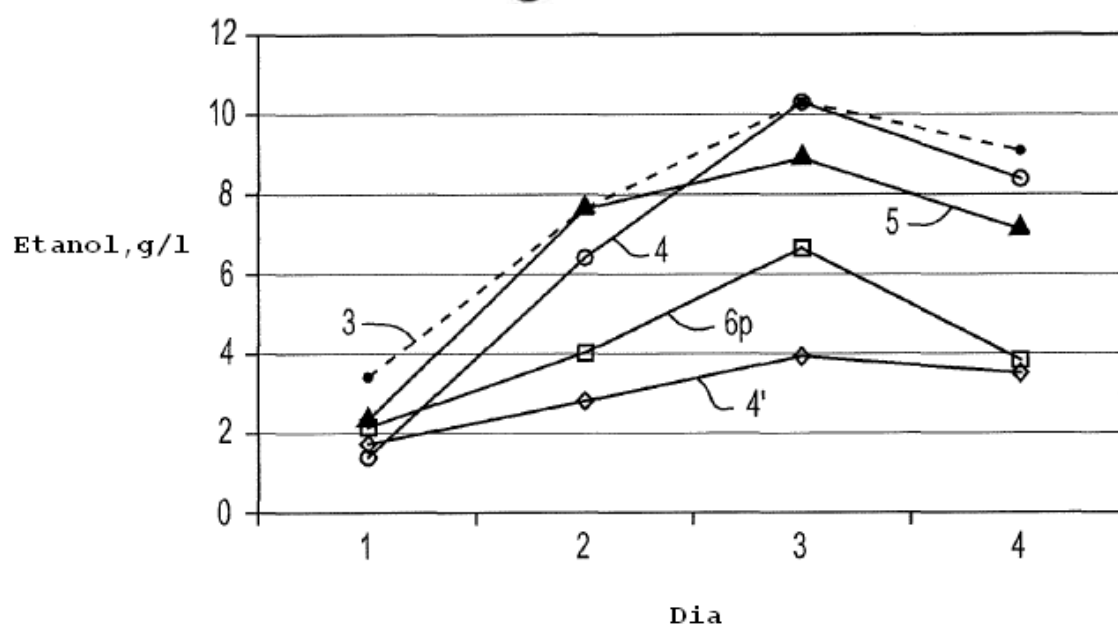
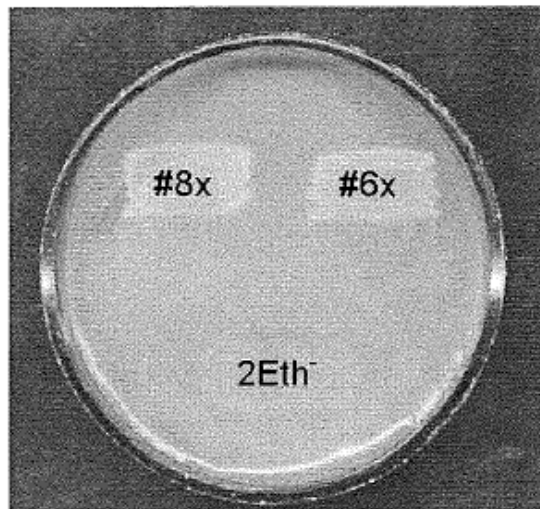


Fig. 16



meio mínimo + 3% de xilana
de madeira de vidoeiro

Fig. 17A

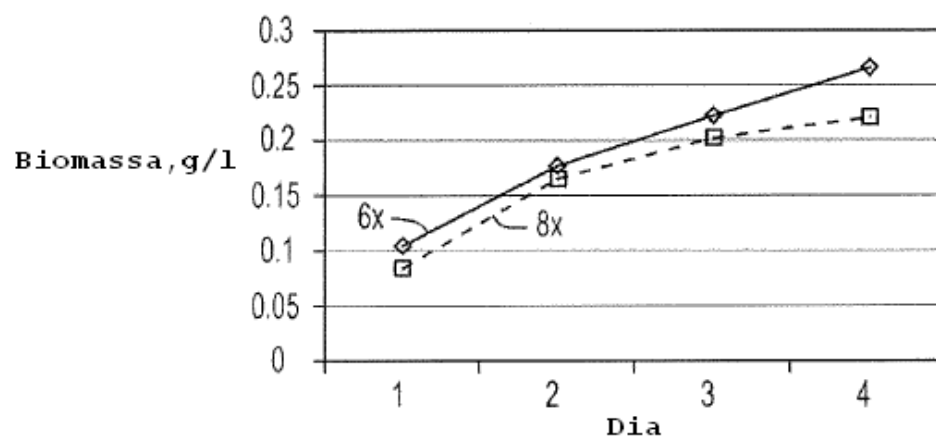


Fig. 17B1

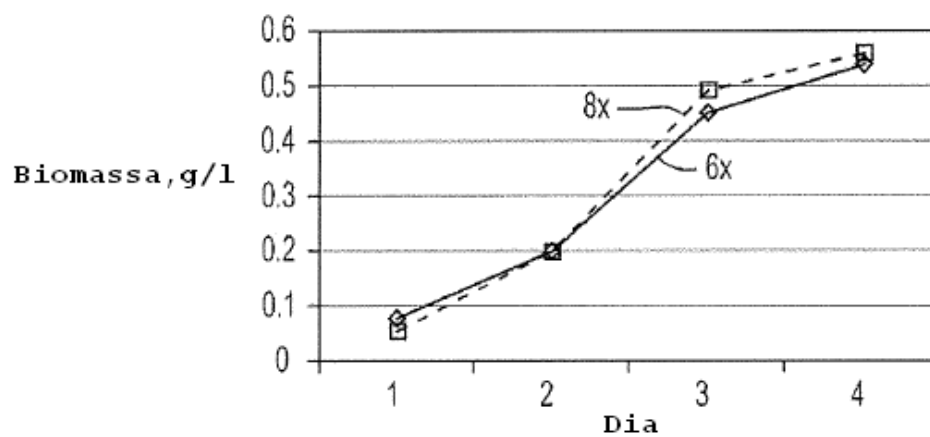
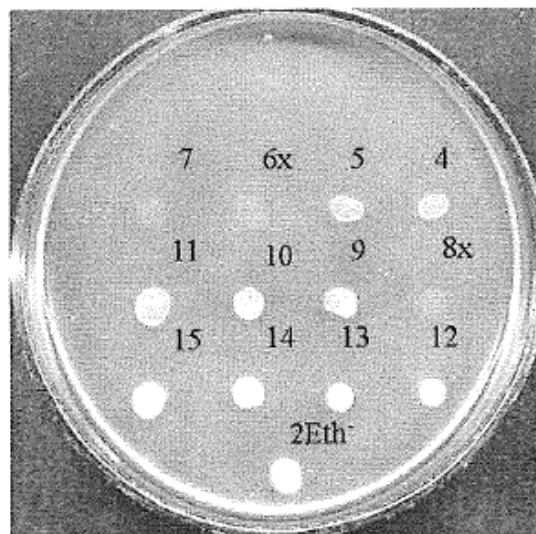


Fig. 17B2

16/17

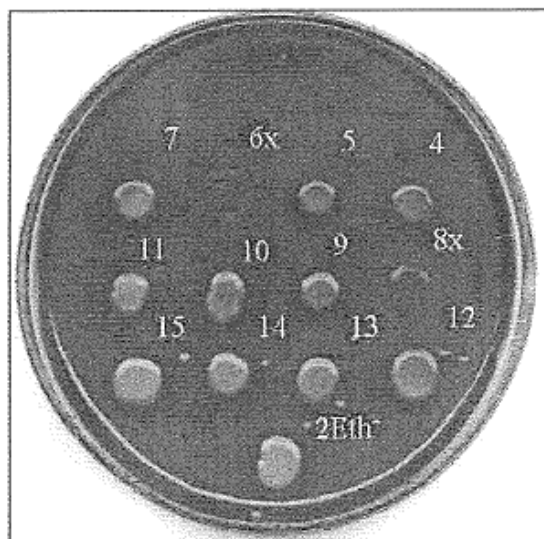
meio mínimo + 2%Glc+1mM de PNPX



visualização da secreção β -xilosidase

Fig. 18A

meio mínimo + 2%Glc+0,2% RBB-xilana



visualização da secreção endoxilanase

Fig. 18B

17/17

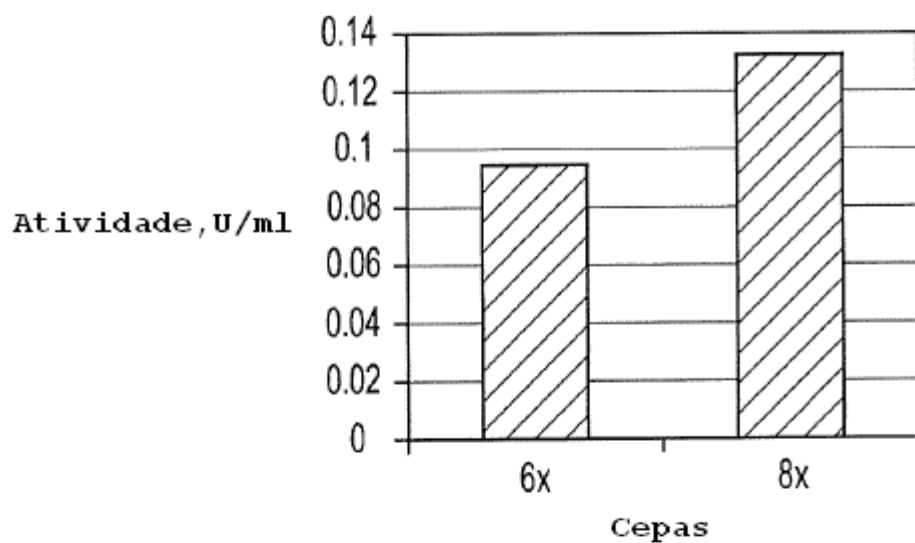


Fig. 19A

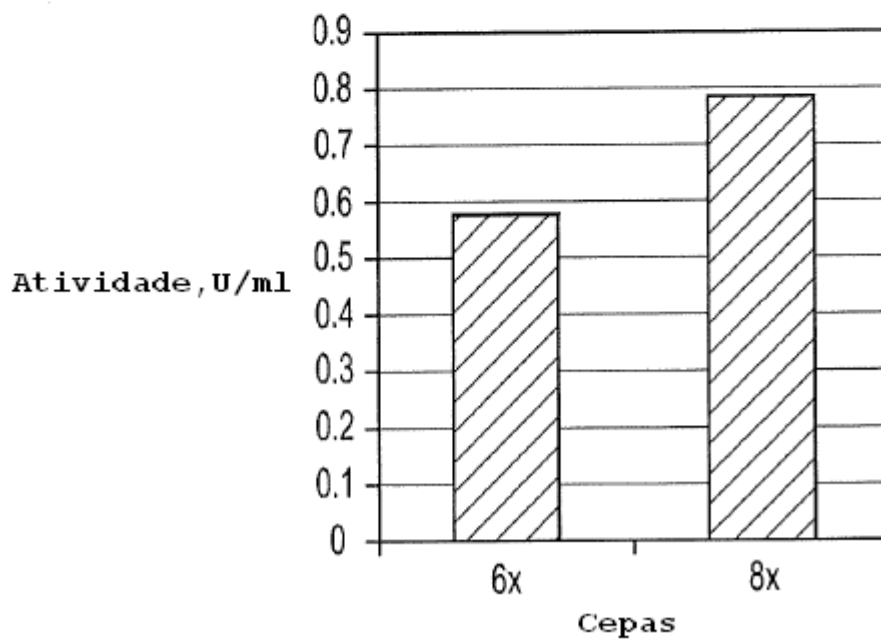


Fig. 19B