



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

(11) PI 0306740-8 B1



(22) Data do Depósito: 23/01/2003

(45) Data de Concessão: 27/08/2019

(54) Título: CÉLULA HOSPEDEIRA TRANSFORMADA COM UM CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLÉICO E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

(51) Int.Cl.: C12N 15/61; C12N 15/54; C12N 1/14; C12N 1/19; C12P 7/10; (...).

(30) Prioridade Unionista: 23/01/2002 EP 02075266.3.

(73) Titular(es): DSM IP ASSETS B.V..

(72) Inventor(es): HUBERTUS JOHANNES MARIE OP DEN CAMP; HARRY RAMANOEDJ HARHANGI; CHRISTIAAN VAN DER DRIFT; JACOBUS THOMAS PRONK.

(86) Pedido PCT: PCT NL2003000049 de 23/01/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/062430 de 31/07/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 06/07/2004

(57) Resumo: "CÉLULA HOSPEDEIRA TRANSFORMADA COM UM CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLÉICO, E, PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL, E DE UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO". A presente invenção refere-se as células hospedeiras transformadas com uma sequência de ácido nucleico codificadora de uma xilose-isomerase eucariótica obtível de um fungo anaeróbico. Quando expressada, a sequência codificadora da xilose-isomerase confere à célula hospedeira a capacidade de converter xilose em xilulose que pode ser adicionalmente metabolizada pela célula hospedeira. Assim, a célula hospedeira é capaz de crescer em xilose como fonte de carbono. A célula hospedeira preferivelmente é um microorganismo eucariótico tal como uma levedura ou um fungo filamentoso. A invenção refere-se adicionalmente aos processos para a produção de produtos de fermentação tal como etanol, no qual uma célula hospedeira da invenção usa xilose para crescimento e para a produção do produto de fermentação. A invenção refere-se adicionalmente às sequências de ácido nucleico codificadoras de xilose-isomerases eucarióticas e de xilulose-quinases obtíveis de fungos anaeróbicos.

**CÉLULA HOSPEDEIRA TRANSFORMADA COM UM CONSTRUTO DE ÁCIDO
NUCLÉICO E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se às células hospedeiras transformadas com uma sequência de ácido nucleico codificadora de uma xilose-isomerase eucariótica. A xila-isomerase é expressada na célula hospedeira para conferir a capacidade de isomerizar xilose à xilulose. A célula hospedeira é usada em um processo para a produção de etanol e de outros produtos de fermentação pela fermentação de um meio contendo pentose. A presente invenção refere-se adicionalmente às sequências de ácido nucleico codificadoras de xilose-isomerases eucarióticas.

Fundamentos da invenção

[002] O consumo em grande escala de combustíveis fósseis (combustíveis baseados em petróleo) tradicionais nas últimas poucas décadas tem contribuído para os altos níveis de poluição. Além do mais, a percepção de que o estoque mundial de petróleo não é ilimitado, combinada com a consciência ambiental crescente, tem estimulado novas iniciativas para a investigação da factibilidade de combustíveis alternativos tal como etanol, que poderiam realizar uma diminuição de 60-90% na produção de CO₂. Embora o etanol derivado de biomassa possa ser produzido por fermentação de açúcares hexose que são obtidos de muitas fontes diferentes, até agora, entretanto, os substratos para a produção em escala industrial de álcool combustível são cana-de-açúcar e amido de grãos. A desvantagem destes substratos são os custos elevados.

[003] A expansão da produção de etanol requer a

capacidade do uso de matérias-primas de custo menor. Presentemente, apenas matéria-prima lignocelulósica de biomassa vegetal estará disponível em quantidades suficientes para substituir as culturas utilizadas para a produção de etanol. Os açúcares de fermentação principais de materiais lignocelulósicos são glicose e xilose, constituindo respectivamente cerca de 40% e 25% de lignocelulose. Entretanto, a maioria das leveduras que são capazes de fermentação alcoólica, como *Saccharomyces cerevisiae*, não são capazes de usarem xilose como uma fonte de carbono. Adicionalmente, não são conhecidos nenhuns microorganismos que podem fermentar xilose a etanol tanto com alto rendimento de etanol quanto com elevada produtividade de etanol. Para se permitir a produção comercial de etanol a partir de hidrolisado de lignocelulose, seria requerido um organismo possuindo ambas estas propriedades. Assim um objetivo da presente invenção é a provisão de uma levedura que seja capaz tanto de fermentação alcoólica quanto do uso de xilose como uma fonte de carbono.

[004] D-Xilose é metabolizável por numerosos microorganismos tais como bactérias entéricas, algumas leveduras e fungos. Na maioria das bactérias utilizadoras de xilose, a xilose é diretamente isomerizada a D-xilulose por xilose (glicose) isomerase (XI). Leveduras e fungos filamentosos, entretanto não são capazes desta isomerização em uma etapa e primeiro reduzem a xilose a xilitol pela ação de xilose-redutase (XR) após a qual o xilitol é convertido à xilulose por xilitol-desidrogenase (XDH). A primeira etapa requer NAD(P)H como um co-fator enquanto que a segunda etapa requer NAD⁺. A xilulose que é produzida subsequentemente

entra na rota de pentose-fosfato (PPP) após a qual ela é fosforilada por xilulose-quinase (XK). Fermentação anaeróbica da xilose a etanol não é possível com uma xilose-redutase (XR) estritamente dependente de NADPH. Isto é porque a xilitol-desidrogenase (XDH) é estritamente dependente de NAD⁺ resultando em um desequilíbrio redox (isto é, depleção de NAD⁺). Para solucionar o desequilíbrio redox sob condições anaeróbicas, o organismo produz subprodutos tais como glicerol e xilitol. Semelhantemente, a produção aeróbica de β -lactamas sobre xilose também é negativamente influenciada em comparação com a produção de β -lactama sobre glicose. Uma causa provável para estes rendimentos baixos é uma demanda relativamente alta de equivalentes redutores na forma de NADPH nesta rota, comparado com o uso de glicose (W. M. van Gulik *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 68, No. 6, June 20, 2000).

[005] No decorrer dos anos muitas tentativas têm sido feitas para a introdução de metabolismo de xilose em *S. cerevisiae* e leveduras semelhantes, como revisto em Zaldivar *et al.* (2001, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 17-34). Uma abordagem concerne à expressão de pelo menos genes codificadores de uma xilose (aldose) redutase e uma xilitol-desidrogenase, por exemplo *XYL1* e *XYL2* de *Pichia stipitis*, em *S. cerevisiae* (US 5.886.382; WO 95/13362; e WO 97/42307). Embora esta abordagem permita o crescimento de *S. cerevisiae* sobre xilose, ela geralmente sofre de uma baixa produtividade ou rendimento de etanol bem como de uma alta produção de xilitol, principalmente como um resultado do desequilíbrio redox entre XR e XDH.

[006] A expressão de uma XI em *S. cerevisiae* ou

levedura relacionada ou em fungos filamentosos evitaria o desequilíbrio redox e as consequentes excreção e produção de xilitol. Os genes de xilose-isomerase de várias bactérias têm sido inseridos em *S. cerevisiae*, entretanto, a expressão de Xis procarióticas mesófilas não levou à XI ativa (Amore e Hollenberg, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 7515; Amore et al., 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 351-357; Chan et al., 1986, *Biotechnol. Lett.* 8:231-234; Chan et al., 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 524-528; Ho et al., 1989, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 42: 2167; Hollenberg, 1987, *EBC-Symposium on Brewers Yeast*, Helsinki (Finlândia), 24-25 Nov.1986; Sarthy et al., 1987, *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1996-2000; Ueng et al. 1985, *Biotechnol. Lett.* 7: 153-158). Contudo, duas XIs de bactérias termófilas expressadas em *S. cerevisiae* mostraram uma atividade específica de 1 μmol por minuto por mg^{-1} a 85°C (Bao et al., 1999, *Weishengwu-Xuebao* 39: 49-54; Walfridson et al., 1996, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4184-4190). Entretanto, em temperatura fisiológica para *S. cerevisiae* (20-35°C) apenas uma percentagem pequena desta atividade é deixada, que não é suficiente para a fermentação alcoólica eficiente a partir de xilose. Portanto, ainda há uma necessidade de ácidos nucleicos codificadores de uma XI que possa ser expressada em leveduras para a provisão de suficiente atividade de XI sob condições fisiológicas para a permissão do uso de xilose como fonte de carbono.

Descrição da invenção

Xilose-isomerase

[007] A enzima "xilose-isomerase" (EC 5.3.1.5) é aqui definida como uma enzima que catalisa a isomerização

direta de D-xilose a D-xilulose e vice-versa. A enzima também é conhecida como uma D-xilose-ceto-isomerase. Algumas xilose-isomerases também são capazes de catalisarem a conversão entre D-glicose e D-frutose e são, portanto, algumas vezes referidas como glicose-isomerase. Xilose-isomerases requerem magnésio como co-fator. Xilose-isomerases da invenção podem ser adicionalmente definidas por sua sequência de aminoácidos como aqui abaixo descrita. Igualmente xilose-isomerases podem ser definidas pelas sequências de nucleotídeos que hibridizam com uma sequência de nucleotídeos de referência codificadora de uma xilose-isomerase como descrita aqui abaixo.

[008] Uma unidade (U) de atividade de xilose-isomerase é aqui definida como a quantidade de enzima que produz 1 nmol de xilulose por minuto, em uma mistura reacional contendo solução-tampão de fosfato 50 mM (pH 7,0), xilose 10 mM e $Mg\ Cl_2$ 10 mM, A 37°C. Xilulose formada foi determinada pelo método de Dische e Borenfreund 1951, *J. Biol. Chem.* 192: 583-587) ou por HPLC como descrito nos Exemplos.

Similaridade e identidade de sequência

[009] Identidade de sequência é aqui definida como uma relação entre duas ou mais sequências de aminoácidos (polipeptídeo ou proteína) ou duas ou mais sequências de ácido nucleico (polinucleotídeo), determinada pela comparação das sequências. Na técnica, "identidade" também significa o grau de relacionamento entre as sequências de aminoácidos e de ácido nucleico, como pode ser o caso, determinado pela combinação entre o segmento de tais sequências. "Similaridade" entre duas sequências de

aminoácidos é determinada pela comparação da sequência de aminoácidos e de seus substitutos de aminoácido conservados de um polipeptídeo com a sequência de um segundo polipeptídeo. "Identidade" e "similaridade" podem ser prontamente calculadas por métodos conhecidos, incluindo mas não limitados àqueles descritos em (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., e Griffin, H. O., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press, 1987; e *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M Stockton. Press, New York, 1991; e Carillo, H., e Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988).

[0010] Métodos preferidos para a determinação da identidade são designados para darem a combinação mais elevada entre as sequências testadas. Métodos para a identificação de identidade e de similaridade estão codificados em programas de computador disponíveis ao público. Métodos de programa de computador preferidos para a determinação da identidade e da similaridade entre duas sequências incluem por exemplo o pacote de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12 (1):387 (1984)), BestFit, BLAST, BLASTN e PASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)). O programa BLAST X está disponível ao público da NCBI e outras fontes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)). O bem conhecido algoritmo de Smith Waterman também

pode ser usado para determinar a identidade.

[0011] Parâmetros preferidos para a comparação de sequências de polipeptídeo incluem os seguintes: "Algorithm: Needleman and Wunsch", *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970); "Comparison matrix: BLOSSUM62 from Hentikoff and Hentikoff", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915-10919 (1992); Gap Penalty: 12; e Gap Length Penalty: 4. Um programa útil com estes parâmetros está disponível ao público como o programa "Ogap" de Genetics Computer Group, localizado em Madison, WI. Os parâmetros acima mencionados são os parâmetros padrão para as comparações de aminoácidos (juntamente sem penalidade para terminais).

[0012] Parâmetros preferidos para comparação de ácidos nucleicos incluem os seguintes: "Algorithm: Needleman and Wunsch", *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970); Comparison matrix: matches= +10, mismatch = 0; Gap Penalty: 50; Gap Length Penalty: 3. Disponível como o programa Gap de Genetics Computer Group, localizado em Madison, WI. Acima são dados os parâmetros padrão para comparações de ácidos nucleicos. Opcionalmente, na determinação do grau de similaridade de aminoácidos, a pessoa experiente também pode considerar as denominadas substituições de aminoácido "conservativas", o que será claro para a pessoa experiente. Substituições de aminoácido conservativas referem-se à intercambialidade de resíduos possuindo cadeias laterais semelhantes. Por exemplo, um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais alifáticas é glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais alifáticas-hidroxiladas é serina e treonina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais contendo amida é

asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos contendo cadeias laterais aromáticas é fenil-alanina, tirosina, e triptofano; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais básicas é lisina, arginina, e histidina; e um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais contendo enxofre é cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácido conservativa preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenil-alanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina e asparagina-glutamina. Variantes de substituição da sequência de aminoácidos aqui descrita são aquelas nas quais pelo menos um resíduo nas sequências descritas tem sido removido e um resíduo diferente inserido em seu lugar. Preferivelmente, a mudança de aminoácido é conservativa. Substituições conservativas preferidas para cada um dos aminoácidos de ocorrência natural são as seguintes: Ala para ser; Arg para lys; Asn para gln ou his; Asp para glu; Cys para ser ou ala; Gln para asn; Glu para asp; Gly para pro; His para asn ou glin; Ile para leu ou val; Leu para ile ou val; Lys para arg; gln ou glu; Met para leu ou ile; Phe para met, leu ou tyr; Ser para thr, Thr para ser, Trp para tyr; Tyr para trp ou phe; e, Val para ile ou leu.

Sequências de ácido nucleico hibridizadoras

[0013] Sequências de nucleotídeos codificadoras de xilose-isomerases ou de xilulose-quinases da invenção também podem ser definidas por sua capacidade de hibridizarem com as sequências de nucleotídeos da SEQ ID NO. 2 ou SEQ ID NO. 4, respectivamente, sob condições de hibridização moderadas, ou preferivelmente rigorosas. Condições de hibridização rigorosas são aqui definidas como condições que permitem que uma sequência de ácido nucleico de pelo menos cerca de 25,

preferivelmente cerca de 50 nucleotídeos, 75 ou 100 e mais preferivelmente de cerca de 200 ou mais nucleotídeos, hibridize em uma temperatura de cerca de 65°C em uma solução compreendendo sal a cerca de 1 M, preferivelmente 6 x SSC ou qualquer outra solução possuindo uma força iônica comparável, e lavagem a 65°C em uma solução compreendendo sal a cerca de 0,1 M, ou menos, preferivelmente 0,2 x SSC ou qualquer outra solução possuindo uma força iônica comparável. Preferivelmente, a hibridização é realizada durante a noite, isto é, pelo menos por 10 horas e preferivelmente a lavagem é conduzida por pelo menos uma hora com pelo menos duas mudanças da solução de lavagem. Estas condições normalmente permitirão a hibridização específica das sequências possuindo 90% ou mais de identidade de sequência.

[0014] Condições moderadas são aqui definidas como condições que permitem que uma sequência de ácido nucleico de pelo menos cerca de 50, preferivelmente cerca de 200 ou mais nucleotídeos, hibridize em uma temperatura de cerca de 45°C em uma solução compreendendo sal a cerca de 1 M, preferivelmente 6 x SSC ou qualquer outra solução possuindo uma força iônica comparável, e lavagem na temperatura ambiente em uma solução compreendendo sal a cerca de 1 M, ou menos, preferivelmente 6 x SSC ou qualquer outra solução possuindo uma força iônica comparável. Preferivelmente, a hibridização é realizada durante a noite, isto é, pelo menos por 10 horas e preferivelmente a lavagem é conduzida por pelo menos uma hora com pelo menos duas mudanças da solução de lavagem. Estas condições normalmente permitirão a hibridização específica das sequências possuindo até 50% de

identidade de sequência. A pessoa experiente na técnica será capaz de modificar estas condições de hibridização com o propósito de especificamente identificar sequências variando em identidade entre 50% e 90%.

Opcionalmente ligado

[0015] Como aqui usado, o termo "operacionalmente ligado" refere-se a uma ligação de elementos de polinucleotídeo em uma relação funcional. Um ácido nucleico estará "operacionalmente ligado" quando for colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou intensificador estará operacionalmente ligado em uma sequência codificadora se afetar a transcrição da sequência codificadora. Operacionalmente ligado significa que as sequências de DNA estando ligadas são tipicamente contíguas e, onde necessário para unir duas regiões codificadoras de proteína, contíguas e em matriz de leitura.

Promotor

[0016] Como aqui usado, o termo "promotor" refere-se a um fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar a transcrição de um ou mais genes, localizado a montante com respeito à direção da transcrição do sítio de iniciação de transcrição do gene, e é estruturalmente identificado pela presença de um sítio de ligação para DNA-dependente-RNA-polimerase, sítios de iniciação de transcrição e quaisquer outras sequências de DNA, incluindo, mas não se limitando aos sítios de ligação de fator de transcrição, sítios de ligação de proteína repressor e ativador, e quaisquer outras sequências de nucleotídeos conhecidas por uma pessoa experiente na técnica para atuar

direta ou indiretamente para regular a quantidade de transcrição do promotor. Um promotor "constitutivo" é um promotor que é ativo sob a maioria das condições de desenvolvimento e ambientais. Um promotor "induzível" é um promotor é ativo sob regulação de desenvolvimento e ambiental.

Descrição detalhada da invenção

[0017] Em um primeiro aspecto a presente invenção refere-se a uma célula hospedeira transformada que possui a capacidade de isomerizar xilose à xilulose. A capacidade de isomerizar xilose à xilulose é conferida à célula hospedeira pela transformação da célula hospedeira com um construto de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificadora de uma xilose-isomerase. A capacidade da célula hospedeira transformada de isomerizar xilose à xilulose é a isomerização direta de xilose à xilulose. Isto é entendido para significar que a xilose é isomerizada à xilulose em uma reação única catalisada por uma xilose-isomerase, em oposição à conversão em duas etapas de xilose à xilulose via um intermediário xilitol catalisada por xilose-redutase e xilitol-desidrogenase, respectivamente.

[0018] A sequência de nucleotídeos codifica uma xilose-isomerase que é preferivelmente expressada na forma ativa na célula hospedeira transformada. Assim, a expressão da sequência de nucleotídeos na célula hospedeira produz uma xilose-isomerase com uma atividade específica de pelo menos 10 U de atividade de xilose-isomerase por mg de proteína a 25°C, preferivelmente de pelo menos 20, 25, 30, 50, 100, 200 ou 300 U por mg a 25°C. A atividade específica de xilose-isomerase expressada na célula hospedeira transformada é

aqui definida como a quantidade de unidades de atividade de xilose-isomerase por mg de proteína de lisado livre de células da célula hospedeira, por exemplo um lisado livre de células de levedura. A determinação da atividade de xilose-isomerase, da quantidade de proteína e a preparação de lisado livre de células são como descritas no Exemplo 1. Alternativamente, a atividade específica pode ser determinada como indicada no Exemplo 4. Consequentemente, a expressão da sequência de nucleotídeos na célula hospedeira produz uma xilose-isomerase com uma atividade específica de pelo menos 50 U de atividade de xilose-isomerase por mg de proteína a 30°C, preferivelmente de pelo menos 100, 200, 500, ou 750 U por mg a 30°C.

[0019] Preferivelmente, a expressão da sequência de nucleotídeos na célula hospedeira produz uma xilose-isomerase com um Km para xilose que é menor do que 50, 40, 30 ou 25 mM com maior preferência, o Km para xilose é de cerca de 20 mM ou menor.

[0020] Uma sequência de nucleotídeos codificadora de xilose-isomerase pode ser selecionada do grupo consistindo de:

(a) sequências de nucleotídeos codificadoras de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 40, 45, 49, 50, 53, 55, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98 ou 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 1;

(b) sequências de nucleotídeos codificadoras de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 40, 50, 55, 56, 57, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98 ou 99% de identidade de sequência com a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO. 2;

(c) sequências de nucleotídeos cuja fita complementar hibridiza em uma sequência de uma molécula de ácido nucleico de (a) ou (b);

(d) sequências de nucleotídeos cuja sequência difere da sequência de uma molécula de ácido nucleico de (c) devido à degeneração do código genético.

[0021] A sequência de nucleotídeos preferivelmente codifica uma xilose-isomerase eucariótica, isto é, uma xilose-isomerase com uma sequência de aminoácidos em um organismo eucariótico. Expressão de uma xilose-isomerase eucariótica aumenta a possibilidade de que a xilose-isomerase seja expressada na forma ativa em uma célula hospedeira eucariótica tal como levedura, em oposição às xilose-isomerases procarióticas mesófilas. Com maior preferência a sequência de nucleotídeos codifica uma xilose-isomerase de planta (por exemplo de *Hordeum vulgare*) ou uma xilose-isomerase de fungo (por exemplo de *Basidiomycete*). Mais preferivelmente, contudo, a sequência de nucleotídeos codifica uma xilose-isomerase de um fungo anaeróbico, para adicionalmente aumentar a possibilidade de expressão em forma enzimaticamente ativa em uma célula hospedeira eucariótica, particularmente em levedura. Mais preferivelmente são sequências de nucleotídeos codificadoras de uma xilose-isomerase de um fungo anaeróbico que pertence às famílias *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Orpinomyces* ou *Ruminomyces*.

[0022] Uma célula hospedeira para a transformação com uma sequência de nucleotídeos codificadora de uma xilose-isomerase preferivelmente é uma hospedeira capaz de ativar

ou passivar o transporte de xilose para dentro da célula. A célula hospedeira preferivelmente contém glicólise ativa, a rota de pentose-fosfato e preferivelmente contém atividade de xilulose-quinase de modo que a xilulose isomerizada da xilose possa ser metabolizada a piruvato. A hospedeira adicionalmente preferivelmente contém enzimas para a conversão de piruvato em um produto de fermentação desejado tal como etanol, etileno ou ácido láctico. Uma célula hospedeira preferida é uma célula hospedeira que é naturalmente capaz de fermentação alcoólica, preferivelmente, fermentação alcoólica anaeróbica. A célula hospedeira adicionalmente preferivelmente possui uma tolerância alta ao etanol e ácidos orgânicos como ácido láctico, ácido acético ou ácido fórmico e aos produtos da degradação de açúcar tais como furfural e hidróxi-metil-furfural. Qualquer uma destas características ou atividades da célula hospedeira pode estar naturalmente presente na célula hospedeira ou pode ser introduzida ou modificada por modificação genética. Uma célula hospedeira adequada é um microorganismo como uma bactéria ou um fungo, contudo, mais adequados como célula hospedeira são leveduras ou fungos filamentosos.

[0023] Leveduras são aqui definidas como microorganismos eucarióticos e incluem todas as espécies da subdivisão *Eumycotina* (Alexopoulos, C. J., 1962, em: *Introduction Mycology*, John Wiley & Sons, Inc., New York) que predominantemente crescem na forma unicelular. Leveduras quer podem crescer por broto de um talo unicelular quer podem crescer por fissão do organismo. Leveduras preferidas como células hospedeiras pertencem aos gêneros *Saccharomyces*,

Kluyveromyces, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* e *Yarrowia*. Preferivelmente a levedura é capaz de fermentação anaeróbica, com maior preferência de fermentação alcoólica anaeróbica.

[0024] Fungos filamentosos são aqui definidos como microorganismos eucarióticos que incluem todas as formas filamentosas da subdivisão *Eumycotina*. Estes fungos são caracterizados por um micélio vegetativo composto de quitina, celulose, e outros polissacarídeos complexos. Os fungos filamentosos da presente invenção são morfológica, fisiológica, e geneticamente distintos de leveduras. Crescimento vegetativo por fungos filamentosos é pelo alongamento hifal e o catabolismo de carbono da maioria dos fungos filamentosos é obrigatoriamente aeróbico. Fungos filamentosos preferidos como células hospedeiras pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* e *Penicillium*.

[0025] No decorrer dos anos sugestões têm sido feitas para a introdução de vários organismos para a produção de bio-etanol a partir de açúcares de cultura. Na prática, contudo, todos os processos principais de produção de bio-etanol têm continuado a usar as leveduras do gênero *Saccharomyces* como produtoras de etanol. Isto é devido às muitas características atrativas da espécie *Saccharomyces* para processos industriais, isto é, alta ácido-, etanol-, e osmo-tolerância, capacidade de crescimento anaeróbico, e claro sua alta capacidade fermentativa alcoólica. Espécies de levedura preferidas como células hospedeiras incluem *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*,

S. diastaticus, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis*.

[0026] A célula é transformada com um construto de ácido nucleico como adicionalmente definido abaixo e pode compreender uma única, mas preferivelmente compreende múltiplas cópias do construto de ácido nucleico. O construto de ácido nucleico pode ser mantido episssomalmente e assim compreende uma sequência para replicação autônoma, tal como uma sequência ARS. Construtos de ácido nucleico episssomais adequados podem se basear por exemplo nos plasmídeos pKD1 ou 2 μ de levedura (Fleer *et al.*, 1991, *Biotechnology* 9: 968-975). Preferivelmente, contudo, o construto de ácido nucleico é integrado em uma ou mais cópias para dentro do genoma da célula hospedeira. A integração para dentro do genoma da célula hospedeira pode ocorrer aleatoriamente por recombinação ilegítima, mas preferivelmente o construto de ácido nucleico é integrado no genoma da célula hospedeira por recombinação homóloga o que é bem conhecido na técnica da genética molecular fúngica (veja por exemplo WO 90/1443, EP-A-0.481.008, EP-A-0.635,574 e US 6.265.186).

[0027] Em uma célula hospedeira transformada preferida de acordo com a invenção, o construto de ácido nucleico confere à célula hospedeira a capacidade de crescer sobre xilose como fonte de carbono, preferivelmente como única fonte de carbono, e preferivelmente sob condições anaeróbicas, por meio das quais preferivelmente a hospedeira transformada produz essencialmente nenhum xilitol, por exemplo o xilitol produzido está abaixo do limite de detecção de por exemplo menor do que 5, 2, 1% do carbono consumido em uma base molar. A célula hospedeira transformada possui a capacidade de crescer sobre xilose como a única fonte de

carbono em uma taxa de pelo menos 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 ou 0,2 h⁻¹. A célula hospedeira transformada da invenção assim expressa uma xilose-isomerase em um nível de atividade específica definido acima.

[0028] Uma célula hospedeira pode compreender outras modificações genéticas que resultam em uma ou mais das características selecionadas do grupo consistindo de: (a) transporte aumentado de xilose para dentro da célula hospedeira; (b) atividade de xilulose-quinase diminuída; (c) fluxo aumentado da rota de pentose-fosfato; (d) sensibilidade diminuída à repressão catabólica; (e) tolerância aumentada ao etanol, à osmolaridade ou aos ácidos orgânicos; e (f) produção reduzida de subprodutos. Subprodutos são entendidos como moléculas contendo carbono diferente do produto de fermentação desejado e incluem por exemplo xilitol, glicerol e/ou ácido acético. Tais modificações genéticas podem ser introduzidas por mutagênese e triagem e/ou seleção clássica para o mutante desejado. Alternativamente, as modificações genéticas podem consistir de sobreexpressão de genes endógenos e/ou de expressão de um gene heterólogo e/ou inativação de genes endógenos. Os genes são preferivelmente escolhidos de genes codificadores de um transportador de hexose ou pentose; de uma xilulose-quinase tal como os genes de xilulose-quinase de *S. cerevisiae* (*XKS1* Deng e Ho, 1990, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24-25: 193-199) ou de *Piromyces* (*xylB*, isto é, SEQ ID NO.4); uma enzima da rota de pentose-fosfato tal como uma transaldolase (*TAL1*) ou uma transcetolase (*TKL1*) (veja por exemplo Meinander et al., 1995, *Pharmacol, Toxicol. Suppl.* 2: 45), enzimas glicolíticas, enzimas etanologênicas tais como álcool-

desidrogenases. Genes endógenos preferidos para inativação incluem um gene de cetose-quinase por exemplo gene *HXK2* de *S. cerevisiae* (veja Diderich et al., 2001, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1587-1593); os genes *MIG1* ou *MIG2* de; genes de aldose-redutase (não-específica) tal como *GRE3* de *S. cerevisiae* (Träff et al., 2001, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5668-5674); genes para enzimas envolvidas no metabolismo de glicerol tais como os genes de glicerol-fosfato-desidrogenase 1 e/ou 2 de *S. cerevisiae*; homólogos (hibridização) dos genes em outras espécies hospedeiras. Outras modificações preferidas das células hospedeiras para a fermentação de xilose são revistas em Zalvidar et al. (2001, *supra*).

[0029] Em outro aspecto a invenção refere-se a uma célula hospedeira transformada para a produção de produtos de fermentação diferentes de etanol. Tais produtos de fermentação não-etanólicos incluem em princípio qualquer composto químico fino ou não-fino que seja produzível por microorganismo eucariótico tal como uma levedura ou um fungo filamentoso. Tais produtos de fermentação incluem por exemplo ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, aminoácidos, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, antibióticos de β -lactama e cefalosporinas.

[0030] A transformação das células hospedeiras com os construtos de ácido nucleico da invenção e a modificação genética adicional das células hospedeiras, preferivelmente leveduras, como descritas acima podem ser realizadas por métodos bem conhecidos na técnica. Tais métodos são por exemplo conhecidos de livros-texto padrão, tais como Sambrook e Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory

Manual (3^a edition), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, ou F. Ausubel et al., eds., "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Métodos para a transformação e a modificação genética das células hospedeiras fúngicas são conhecidos de por exemplo EP-A-0.635.574, WO 98/46772, WO 99//60102 e WO 00/37671.

[0031] Em outro aspecto a invenção refere-se a um construto de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificadora de uma xilose-isomerase como definida acima e usado para a transformação de uma célula hospedeira como definida acima. No construto de ácido nucleico, a sequência de nucleotídeos codificadora da xilose-isomerase preferivelmente está operacionalmente ligada em um promotor para controle e iniciação da transcrição da sequência de nucleotídeos em uma célula hospedeira como definida abaixo. O promotor preferivelmente é capaz de causar suficiente expressão da xilose-isomerase na célula hospedeira, para conferir à célula hospedeira a capacidade de isomerizar xilose à xilulose. Preferivelmente, o promotor causa uma atividade de xilose-isomerase específica na célula hospedeira como definida acima. Promotores úteis nos construtos de ácido nucleico da invenção incluem tanto os promotores naturais induzíveis constitutivos quanto os promotores engenheiros. Um promotor preferido para uso na presente invenção será em adição insensível à repressão catabólica (glicose) e/ou preferivelmente não requererá xilose para indução. Promotores possuindo estas características estão amplamente disponíveis e são conhecidos pela pessoa experiente.

Exemplos apropriados de tais promotores incluem por exemplo promotores de levedura dos genes glicolíticos, tais como os promotores de fosfofrutoquinase (PPK) de levedura, triose-fosfato-isomerase (TPI), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GPD, TDH3 ou GAPDH), piruvato-quinase (PYK), fosfoglicerato-quinase (PGK); mais detalhes sobre tais promotores podem ser encontrados em (WO 93/03159). Outros promotores úteis são promotores de gene codificador de proteína ribossomal, o promotor de gene de lactose (LAC4), promotores de álcool-desidrogenase (ADH1, ADH4 e semelhantes), e o promotor de enolase (ENO). Outros promotores, tanto constitutivos quanto induzíveis e os intensificadores ou sequências de ativação a montante serão conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica. Os promotores utilizados nos construtos de ácidos nucleico da presente invenção podem ser modificados, se desejado, para afetarem suas características de controle. Preferivelmente, o promotor empregado no construto de ácido nucleico para a expressão de xilose-isomerase é homólogo à célula hospedeira na qual a xilose-isomerase é expressada.

[0032] No construto de ácido nucleico, a extremidade 3' da sequência de ácido nucleico codificadora de xilose-isomerase preferivelmente está operacionalmente ligada em uma sequência de terminador de transcrição. Preferivelmente a sequência de terminador é operacional em uma célula hospedeira escolhida, tal como por exemplo a espécie de levedura escolhida. Em qualquer caso a escolha do terminador não é crítica, pode ser por exemplo de qualquer gene de levedura, embora terminadores possam algumas vezes funcionar se de um gene, eucariótico, de não-levedura. A sequência de

terminação de transcrição adicionalmente preferivelmente compreende um sinal de poliadenilação.

[0033] Opcionalmente, um marcador selecionável pode estar presente no construto de ácido nucleico. Como aqui usado, o termo "marcador" refere-se a um gene codificador de uma característica ou um fenótipo que permite a seleção de, ou triagem de, uma célula hospedeira contendo o marcador. O gene marcador pode ser um gene de resistência a antibiótico por meio do qual o antibiótico apropriado pode ser usado para selecionar células transformadas dentre as células que não estão transformadas. Exemplos de marcadores de resistência a antibiótico adequados incluem por exemplo di-hidrofolato-redutase, higromicina-B-fosfo-transferase, 3'-O-fosfo-transferase II (resistência à canamicina, à neomicina e a G418). Embora os marcadores de resistência a antibiótico possam ser mais convenientes para a transformação de células hospedeiras poliploides, preferivelmente, contudo, marcadores de resistência a antibiótico não são usados, tais como marcadores auxotróficos (URA3, TRP1, LUE2) ou o gene de TPI de *S. pombe* (descrito por Russell P.R., 1985, *Gene* 40:125-130). Em uma modalidade preferida as células hospedeiras transformadas com os construtos de ácido nucleico estão livres de gene marcador. Métodos para a construção de células hospedeiras microbianas livres de gene marcador recombinantes são descritos em EP-A-0.635.574 e baseiam-se no uso de marcadores bidirecionais tais como o gene *amdS* de *A. nidulans* (acetamidase) ou os genes URA3 e LYS2 de levedura. Alternativamente, um marcador selecionável tal como uma Proteína Fluorescente Verde, *lacZ*, luciferase,

cloranfenicol-acetil-transferase, beta-glicuronidase pode ser incorporado nos construtos de ácido nucleico da invenção permitindo a triagem de células transformadas.

[0034] Outros elementos opcionais que podem estar presentes nos construtos de ácido nucleico da invenção incluem, mas não se limitam a, uma ou mais sequências líderes, intensificadores, fatores de integração, e/ou genes repórter, sequências de intron, centrômeros, telômeros e/ou sequências de fixação de matriz (MAR). Os construtos de ácido nucleico da invenção podem adicionalmente compreender uma sequência para replicação autônoma, tal como uma sequência ARS. Construtos de ácido nucleico episomais adequados podem por exemplo se basear nos plasmídeos pKD1 ou 2 μ de levedura (Fleer et al., 1991, *Biotechnology* 9:968-975). Alternativamente o construto de ácido nucleico pode compreender sequências para a integração, preferivelmente por recombinação homóloga. Tais sequências podem, portanto, ser sequências homólogas ao sítio alvo para a integração no genoma da célula hospedeira. Os construtos de ácido nucleico da invenção podem ser proporcionados em uma maneira per se conhecida, que em geral envolve técnicas tais como restrição e ligação de sequências de ácido nucleico e/ou de ácidos nucleicos, para as quais é feita referência aos livros-texto, tais como Sambrook e Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ou F. Ausubel et al., eds., "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

[0035] Em outro aspecto a invenção refere-se a uma

molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica uma xilose-isomerase. A molécula de ácido nucleico é preferivelmente selecionada do grupo consistindo de:

(a) moléculas de ácido nucleico codificadoras de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 50, 53, 54, 55, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, ou 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.1;

(b) moléculas de ácido nucleico codificadoras de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 50, 56, 57, 58, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, ou 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.2;

(c) moléculas de ácido nucleico cuja fita complementar hibridiza em uma sequência de molécula de ácido nucleico de (a) ou (b);

(d) moléculas de ácido nucleico cuja sequência difere da sequência de uma molécula de ácido nucleico de (c) devido à degeneração do código genético.

[0036] Alternativamente, uma molécula de ácido nucleico de (a) pode codificar um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 67, 68, 69, 70, 80, 90, 95, 97, 98, ou 99% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 1. Uma molécula de ácido nucleico de (c) preferivelmente hibridiza sob condições moderadas, com maior preferência sob condições rigorosas como aqui definidas acima. Preferivelmente a molécula de ácido nucleico é de um eucarioto, com maior preferência de um microorganismo

eucariótico tal como um fungo, mais preferivelmente de um fungo anaeróbico, tal como por exemplo aqueles fungos anaeróbicos descritos acima.

[0037] Em ainda outro aspecto a invenção se refere a uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica uma xilulose-quinase, preferivelmente uma D-xilulose-quinase. Uma D-xilulose-quinase (EC 2.7.1.17; também referida como uma D-xilulosequinase) é aqui definida como uma enzima que catalisa a conversão de D-xilulose em xilulose-5-fosfato. A molécula de ácido nucleico é preferivelmente selecionada do grupo consistindo de:

(a) moléculas de ácido nucleico codificadoras de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 45, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, ou 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 3;

(b) moléculas de ácido nucleico codificadoras de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 30, 37, 38, 39, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, ou 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 4;

(c) moléculas de ácido nucleico cuja fita complementar hibridiza em uma sequência de molécula de ácido nucleico de (a) ou (b); e

(d) moléculas de ácido nucleico cuja sequência difere da sequência de uma molécula de ácido nucleico de (c) devido à degeneração do código genético.

[0038] Alternativamente, uma molécula de ácido nucleico de (a) pode codificar um polipeptídeo compreendendo

uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 64, 65, 66, 70, 80, 90, 95, 97, 98, ou 99% de similaridade de sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 3. Uma molécula de ácido nucleico (c) preferivelmente hibridiza sob condições moderadas, com maior preferência sob condições rigorosas como aqui definidas acima. Preferivelmente a molécula de ácido nucleico é de um eucarioto, com maior preferência de um microorganismo eucariótico tal como um fungo, mais preferivelmente de um fungo anaeróbico, tal como por exemplo aqueles fungos anaeróbicos descritos acima.

[0039] Em um outro aspecto a invenção refere-se aos processos de fermentação nos quais as células hospedeiras transformadas da invenção são usadas para a fermentação de fonte de carbono compreendendo uma fonte de xilose, tal como xilose. Em adição a uma fonte de xilose a fonte de carbono no meio de fermentação também pode compreender uma fonte de glicose. A fonte de xilose ou glicose pode ser xilose ou glicose como tal ou pode ser qualquer oligo- ou polímero de carboidrato compreendendo unidades de xilose ou de glicose, tais como por exemplo lignocelulose, xilanos, celulose, amido e semelhantes. Para a liberação de unidades de xilose ou de glicose de tais carboidratos, carboidrases adequadas (tais como xilanases, glicanases, amilases e semelhantes) podem ser adicionadas no meio de fermentação ou podem ser produzidas pela célula hospedeira transformada. No último caso a célula hospedeira transformada pode ser geneticamente engenhada para produzir e excretar tais carboidrases. Em um processo preferido a célula hospedeira transformada fermenta tanto xilose quanto glicose, preferivelmente simultaneamente em cujo caso é empregada preferivelmente uma célula

hospedeira transformada que é insensível à repressão de glicose para prevenir crescimento diáuxico. Em adição a uma fonte de xilose (e glicose) como fonte de carbono, o meio de fermentação adicionalmente compreenderá o ingrediente apropriado requerido para o crescimento da célula hospedeira transformada. Composições de meios de fermentação para o crescimento de microorganismos tais como leveduras são bem conhecidos na técnica.

[0040] O processo de fermentação é um processo para a produção de um produto de fermentação tal como etanol, ácido lático, ácido succínico, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, antibióticos de β -lactama tais como Penicilina G ou Penicilina V e seus derivados fermentativos e cefalosporinas. O processo de fermentação pode ser um processo de fermentação aeróbico ou anaeróbico. Um processo de fermentação anaeróbico é aqui definido como um processo de fermentação operado na ausência de oxigênio ou no qual substancialmente nenhum oxigênio é consumido, por exemplo menos do que 5 mmol/L/h, e no qual moléculas orgânicas servem tanto como doadoras de elétrons quanto como receptores de elétrons. Na ausência de oxigênio, NADH produzido em glicólise e formação de biomassa, não pode ser oxidado por fosforilação oxidativa. Para solucionar este problema muitos microorganismos usam piruvato ou um de seus derivados como um receptor de elétrons e de hidrogênio para deste modo regenerarem NAD^+ . Assim, em um processo de fermentação anaeróbica preferido piruvato é usado como um receptor de elétrons (e de hidrogênio) e é reduzido aos produtos de fermentação tais como etanol, ácido lático, 1,3-propanodiol, etileno, ácido acético ou ácido succínico.

[0041] O processo de fermentação é preferivelmente realizado em uma temperatura que é ótima para a célula hospedeira transformada. Assim, para a maioria das células hospedeiras de levedura ou de fungo, o processo de fermentação é conduzido em uma temperatura que é menor do que 38°C. Para células hospedeiras de levedura ou de fungo, o processo de fermentação é preferivelmente realizado em uma temperatura que é menor do que 35, 33, 30 ou 28°C e em uma temperatura que é maior do que 20, 22 ou 25°C.

[0042] Um processo preferido é um processo para a produção de etanol, por meio do qual o processo compreende as etapas de: (a) fermentar um meio contendo uma fonte de xilose com uma célula hospedeira transformada como definida acima, por meio do qual a célula hospedeira fermenta xilose e etanol; e opcionalmente, (b) recuperar o etanol. O meio de fermentação também pode compreender uma fonte de glicose que também é fermentada a etanol. No processo a produtividade volumétrica de etanol é preferivelmente de pelo menos 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 5,0 ou 10,0 g de etanol por litro por hora. O rendimento de etanol sobre xilose e/ou glicose no processo preferivelmente é de pelo menos 50, 60, 70, 90, 95 ou 98%. O rendimento de etanol é aqui definido como uma percentagem do rendimento teórico, que, para a glicose e a xilose é de 0,51 g de etanol por g de glicose ou xilose.

[0043] Em um outro aspecto a invenção refere-se a um processo para a produção de um produto de fermentação selecionado do grupo consistindo de ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, aminoácidos, 1,2-propano-diol, etileno, glicerol, antibióticos de β -lactama e cefalosporinas. O processo preferivelmente compreende as

etapas de: (a) fermentar um meio contendo uma fonte de xilose com uma célula hospedeira transformada como definida aqui acima, por meio do qual a célula hospedeira fermenta xilose ao produto de fermentação, e opcionalmente, (b) recuperar o produto de fermentação. Em um processo preferido, o meio também contém uma fonte de glicose.

Descrição das figuras

[0044] **Figura 1.** Curvas de crescimento de transformante de *S. cerevisiae* crescido sobre meio contendo galactose a 25 mM e xilose a 100 mM como fonte de carbono. Transformante pYes contém um vetor de expressão em levedura sem inserção. Transformantes 14.3, 16.2.1 e 16.2.2 são transformados com o vetor pYES contendo sequência codificadora de xilose-isomerase de *Piromyces* sp. E2

Exemplos

Exemplo 1

Clonagem de cDNAs de xilulose-quinase e de xilose-isomerase de *Piromyces*

Organismos e condições de crescimento

[0045] O fungo anaeróbico *Piromyces* sp. E2 (ATCC 76762), isolado das fezes de um elefante indiano, foi crescido anaerobicamente sob N₂/CO₂ (80%/20%) a 39°C em meio M2 suplementado com várias fontes de carbono (24). Fontes de carbono usadas foram Avicel (celulose microcristalina do tipo PH 105, Serva, Alemanha), frutose ou xilose (todas a 0,5%, p/v). Após a cessação do crescimento, julgada pela produção de hidrogênio, as células foram coletadas por centrifugação (15.000 x g, 4°C, 15 min); ou por filtração sobre tela de náilon (tamanho de poro de 30 µm).

Preparação do extrato livre de células

[0046] As células fúngicas lavadas com água deionizada para a remoção dos componentes do meio. Os extratos livres de células foram preparados por congelamento das células em nitrogênio líquido e subsequente moagem com glóbulos de vidro (diâmetro de 0,10-0,11 mm) em um almofariz. Solução-tampão de Tris/HCl (100 mM, pH 7,0) foi adicionada no pó (1:1, p/v) e após descongelamento por 15 min a suspensão foi centrifugada (18.000 x g, 4°C, 15 min). O sobrenadante transparente foi usado como uma fonte de enzimas intracelulares.

Ensaio de enzima

[0047] Atividade de xilose-isomerase foi ensaiada a 37°C em uma mistura reacional contendo solução-tampão de fosfato a 50 mM (pH 7,0), xilose a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM e uma quantidade adequada de extrato livre de células. A quantidade de xilulose formada foi determinada pelo método de cisteína-carbazol (9). As atividades de xilulose-quinase e de xilose-redutase foram ensaiadas como descrito por Witteveen *et al.* (28). Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima produzindo 1 nmol de xilulose por min sob as condições do ensaio. Xilulose formada foi determinada pelo método de Dische e Borenfreund 1951, *J. Biol. Chem.* 192: 583-587) ou por HPLC usando uma coluna Biorad HPX-87N operada a 80°C e eluída a 0,6 mL/min utilizando Na₂HPO₄ a 0,01 M como o eluente. Xilose e xilulose foram detectadas por um detector de Índice de Refração em uma temperatura interna de 60°C.

[0048] A atividade específica é expressada como unidades por mg de proteína. Proteína foi determinada com o reagente de proteína Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories,

Richmond, CA, USA) com γ -globulina bovina como um padrão.

Sequenciamento aleatório de uma biblioteca de Cdna de *Piromyces* sp. E2

[0049] A biblioteca de cDNA construída no vetor lambda ZAPII como descrito previamente (2) foi usada. Uma alíquota desta biblioteca foi convertida em clones de pBluescript SK por excisão de massa com "ExAssist helper phage" (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Clones selecionados aleatoriamente foram sequenciados com o iniciador reverso M13 para se obterem sequências de parte de 5'. cDNAs incompletos foram usados para a síntese de sondas que foram empregadas para o reexame da biblioteca. Para se obterem as sequências de comprimento total subclones foram gerados em pUC18. Sequenciamento foi realizado com o sequenciador automático ABI prism 310 com o kit de sequenciamento de DNA por reação útil de sequenciamento cíclico do terminador dRhodamine" (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Resultados

[0050] Clones aleatoriamente selecionados de uma biblioteca de cDNA do fungo anaeróbico *Piromyces* sp. E2 foram sequenciados e isto resultou em dois clones (pH97 e pAK44) cujas sequências mostraram homologia alta em relação aos genes de xilose-isomerase e de D-xiluloquinase, respectivamente. Os clones foram analisados em detalhe.

[0051] Clone pH97 não conteve uma ORF completa e, portanto, a biblioteca de cDNA foi reexaminada com uma sonda projetada baseando-se nos dados de sequência do clone pH97. Isto resultou em um clone de pR3 com um inserto de 1669 pb. Uma ORF codificadora de uma proteína de 437 aminoácidos com alta similaridade às xilose-isomerases pôde ser

identificada. Embora a região não-traduzida 5' compreenda apenas 4 pb, o resíduo de metionina de iniciação presumido encaixou-se bem em um alinhamento de sequências de xilose-isomerase conhecidas. A região não-traduzida 3' foi de comprimento de 351 pb e teve um alto conteúdo de AT, que é típico de fungos anaeróbicos. A ORF continha os aminoácidos, que como mostrado, são importantes para a interação com o substrato (triade catalítica His 102, Asp 105, Asp 340 e Lys 235) e a ligação de magnésio (Glu 232) (14,26). Em adição, dois padrões de assinatura (resíduos 185-194 e 230-237) desenvolvidos para xilose-isomerases (20) estavam presentes. A xilose-isomerase de *Piromyces* sp. E2 (XylA) mostra a homologia mais elevada para as enzimas de *Haemophilus influenza* (identidade de 52%, similaridade de 68%), e de *Hordeum vulgare* (identidade de 49%, similaridade de 67%). O polipeptídeo deduzido da sequência de cDNA corresponde a uma massa molecular de 49.395 Da e tem um pI calculado de 5,2.

[0052] O segundo clone, pAK44, teve um inserto de 2041 pb e continha uma ORF completa codificadora de uma proteína de 494 aminoácidos com um peso molecular de 53.158 Da e um pI de 5,0. A primeira metionina é precedida por uma região não-traduzida de 5' de 111 pb, enquanto que a região não-traduzida de 3' compreendia 445 pb. Ambas as regiões são ricas em AT. Pesquisas por BLAST e FASTA revelaram alta similaridade com xiluloquinases. As duas regiões de consenso de fosfato definidas por Rodriguez-Pefia *et al.* (22) foram verificadas nas posições 6-23 e 254-270 como mostrado em um alinhamento parcial. Em adição, as assinaturas para esta família de carboidrato-quinase como descrita no banco de dados de Prosite foram identificadas (131-145 e 351-372). A

xilulose-quinase (XylB) de *Piromyces* sp. E2 mostrou homologia mais elevada com a proteína XylB de *Haemophilus influenza* (identidade de 46%, similaridade de 64%).

Exemplo 2

Expressão de xilose-isomerase de *Piromyces* sp. E2 em *Saccharomyces cerevisiae*

[0053] cDNA de *Piromyces* sp. E2 foi usado em uma reação de PCR com *pfu* polimerase (Stratagene). Os iniciadores foram projetados usando as sequências das extremidades 5' e 3' do gene de xilose-isomerase e também continham um sítio de restrição Sfi e XbaI. O produto da PCR foi clonado no vetor pPICZα (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para se obter o gene de xilose-isomerase, o vetor pPICZα foi digerido com EcoRI e XbaI. O produto da digestão foi ligado no vetor pYes2 (Invitrogen). O plasmídeo pYes2 com o gene de xilose-isomerase foi transformado em *Saccharomyces cerevisiae* (cepa BJ1991, doada por Beth Jones, UvA). O genótipo desta cepa é: *matα*, *leu2*, *trp1*, *ura 3-251*, *prb-1-1122* e *pep4-3*. Transformantes foram plaqueados sobre placas SC (0,67% de meio YNB=0,05% de L-Trp + 2% de glicose + 2% de agarose). Células não transformadas não podem crescer sobre estas placas.

Indução

[0054] Células de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas foram crescidas sobre meio de glicose a 25°C por 72 h (rafinose pode ser usada como uma alternativa para a glicose). Células foram cultivadas e ressuspensas em meio SC com galactose no lugar de glicose. Após 8 h de indução as células foram coletadas e lisadas usando glóbulos de vidro (diâmetro de 0,10-0,11 mm) e "solução-tampão de

fragmentação" (tampão de fosfato a 50 mM + 5% de glicerol + inibidor de protease). Após a lise a mistura foi centrifugada (18.000 x g, 4°C, 15 min). O sobrenadante límpido foi usado para determinar a atividade de xilose-isomerase utilizando o método descrito acima (Exemplo 1). Uma atividade de 10 U por mg de proteína foi medida a 37°C.

Exemplo 3

Crescimento sobre xilose de cepas de levedura transformada

Composição do meio

[0055] Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas sobre meio SC com a seguinte composição: 0,67% (p/v) de base nitrogenada de levedura; 0,01% (p/v) de L-triptofano; 0,01% (p/v) de L-leucina e quer glicose, galactose ou xilose, quer uma combinação destes substratos (veja abaixo). Para placas de ágar o meio foi suplementado com 2% (p/v) de ágar bacteriológico.

Experimento de crescimento

[0056] Cepa BJ1991 de *Saccharomyces cerevisiae* (genótipo: $\text{mat}\alpha$, *leu2*, *trp1*, *ura 3-251*, *prb-1-1122* e *pep4-3*) transformada com pYes2 sem inserção e três transformantes selecionados (16.2.1; 16.2.2 e 14.3) contendo pYes2 com o gene de xilose-isomerase de *Piromyces* sp. E2 foram crescidos sobre placas de SC com glicose a 10 mM como fonte de carbono. Quando as colônias foram visíveis, colônias individuais foram usadas para a inoculação de meio SVC líquido com xilose a 100 mM e galactose a 25 mM como fontes de carbono. Crescimento foi monitorado pela medição do aumento na densidade óptica a 600 nm em um espectrofotômetro LKB Ultrospec K.

Resultados

[0057] Os resultados dos experimentos de crescimento são compilados na Figura 1. A cultura com a cepa BJ1991 transformada com pYes2 sem inserção mostra um aumento na OD₆₆₀ até em 80h. Após este tempo uma diminuição gradual é observada. Isto é causado pela agregação das células de levedura que é com frequência observada no final do crescimento. As culturas com os três transformantes não interromperam o crescimento após 80 h e mostram um aumento adicional até pelo menos 150 h.

Exemplo 4

Construção de um vetor de expressão em levedura novo, melhorado para a expressão constitutiva de xilose-isomerase de Piromyces sp. E2 em Saccharomyces cerevisiae

[0058] O vetor pPICZ α , contendo o gene de Piromyces sp. E2 codificador de xilose-isomerase, foi usado como um modelo para a PCR com Vent_R DNA polimerase (New England Biolabs). Os iniciadores foram projetados usando as sequências 3' e 5' do gene codificador de xilose-isomerase e incluíram um sítio EcoRI e SpeI. Adicionalmente os iniciadores foram projetados para a remoção do sítio XbaI encontrado no construto pPICZ α , substituindo-o por um códon de terminação (TAA). O produto final foi projetado para restaurar a matriz de leitura aberta original, sem os aminoácidos adicionados (marcadores his e cMyc) verificados no construto pPICZ α . O produto da PCR foi cortado com EcoRI e SpeI. O produto final foi clonado em um vetor derivado de pYES2 (Invitrogen). Neste vetor o promotor GAL1 encontrado em pYES2 foi substituído pelo promotor TPII com o propósito de garantir a expressão constitutiva da xilose-isomerase, eliminando deste modo a necessidade de galactose no meio. O

promotor TPII foi clonado de uma forma modificado de plasmídeo pYX012 (R&R systems). O promotor foi cortado como um fragmento NheI-EcoRI. Ambos o promotor TPII e o produto da PCR do gene codificador de xilose-isomerase foram ligados em pYES2 cortado com SpeI e XbaI. Este plasmídeo foi usado para transformar a cepa CEN.PK113-5D de *Saccharomyces cerevisiae* (doação de Peter Kötter, Frankfurt). O genótipo da cepa é: *MatA ura3-52*. Transformantes foram selecionados sobre placas de meio mineral (Versuyn *et al.*: "Effect of benzoic acid on metabolismo fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation" (1992) *Yeast* 8(7):501-17) com 2% de glicose como a fonte de carbono. As células não transformadas não podem crescer sobre estas placas. Os transformantes foram crescidos sobre misturas de glicose/xilose em culturas quimiostáticas limitadas em carbono. Os transformantes crescidos sob estas condições exibiram altas atividades de xilose-isomerase (800 unidades por mg a 30°C) de acordo com um ensaio de enzima específico como desenvolvido por Kersters-Hildersson *et al.* ("Kinetic characterization of D-xyllose isomerases by enzymatic assays using D-sorbitol dehydrogenase", *Enz. Microb. Technol.* 9 (1987) 145-148). A atividade *in vitro* de xilose-isomerase nos extratos livres de células da cepa de *S. cerevisiae* transformada foi dependente de cátions bivalentes (Mg^{2+} ou Co^{2+}) e um valor de K_m relativamente baixo para a xilose de aproximadamente 20 mM foi medido.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Royal Nedalco B.V.

<120> CÉLULA HOSPEDEIRA TRANSFORMADA COM UM CONSTRUTO DE
 ÁCIDO NUCLÉICO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, E,
 PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL, E DE UM PRODUTO DE
 FERMENTAÇÃO

<130> xilose-isomerase de *Piromyces*

<140> BO 44829

<141> 2001-12 -31

<160> 4

<170> Patentln Ver. 2.1

<210> 1

<211> 437

<212> PRT

<213> *Piromyces* sp.

<400> 1

Met	Ala	Lys	Glu	Tyr	Phe	Pro	Gln	Ile	Gln	Lys	Ile	Lys	Phe	Glu
1				5					10				15	
Gly	Lys	Asp	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Tyr	Asp	Ala
				20					25				30	
Glu	Lys	Glu	Val	Met	Gly	Lys	Lys	Met	Lys	Asp	Trp	Leu	Arg	Phe
				35					40				45	
Ala	Met	Ala	Trp	Trp	His	Thr	Leu	Cys	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp	Gln
				50					55				60	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Ser	Phe	Pro	Trp	Asn	Glu	Gly	Thr	Asp

	65		70		75
Ala Ile Glu Ile	Ala Lys Gln Lys Val	Asp Ala Gly Phe Glu Ile			
	80		85		90
Met Gln Lys Leu	Gly Ile Pro Tyr Tyr	Cys Phe His Asp Val Asp			
	95		100		105
Leu Val Ser Glu	Gly Asn Ser Ile Glu	Glu Tyr Glu Ser Asn Leu			
	110		115		120
Lys Ala Val Val	Ala Tyr Leu Lys Glu	Lys Gln Lys Glu Thr Gly			
	125		130		135
Ile Lys Leu Leu	Trp Ser Thr Ala Asn	Val Phe Gly His Lys Arg			
	140		145		150
Tyr Met Asn Gly	Ala Ser Thr Asn Pro	Asp Phe Asp Val Val Ala			
	155		160		165
Arg Ala Ile Val	Gln Ile Lys Asn Ala	Ile Asp Ala Gly Ile Glu			
	170		175		180
Leu Gly Ala Glu	Asn Tyr Val Phe Trp	Gly Gly Arg Glu Gly Tyr			
	185		190		195
Met Ser Leu Leu	Asn Thr Asp Gln Lys	Arg Glu Lys Glu His Met			
	200		205		210
Ala Thr Met Leu	Thr Met Ala Arg Asp	Tyr Ala Arg Ser Lys Gly			
	215		220		225
Phe Lys Gly Thr	Phe Leu Ile Glu Pro	Lys Pro Met Glu Pro Thr			
	230		235		240
Lys His Gln Tyr	Asp Val Asp Thr Glu	Thr Ala Ile Gly Phe Leu			
	245		250		255
Lys Ala His Asn	Leu Asp Lys Asp Phe	Lys Val Asn Ile Glu Val			
	260		265		270
Asn His Ala Thr	Leu Ala Gly His Thr	Phe Glu His Glu Leu Ala			
	275		280		285
Cys Ala Val Asp	Ala Gly Met Leu Gly	Ser Ile Asp Ala Asn Arg			

	290		295		300
Gly Asp Tyr Gln Asn Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Ile Asp					
	305		310		315
Gln Tyr Glu Leu Val Gln Ala Trp Met Glu Ile Ile Arg Gly Gly					
	320		325		330
Gly Phe Val Thr Gly Gly Thr Asn Phe Asp Ala Lys Thr Arg Arg					
	335		340		345
Asn Ser Thr Asp Leu Glu Asp Ile Ile Ile Ala His Val Ser Gly					
	350		355		360
Met Asp Ala Met Ala Arg Ala Leu Glu Asn Ala Ala Lys Leu Leu					
	365		370		375
Gln Glu Ser Pro Tyr Thr Lys Met Lys Lys Glu Arg Tyr Ala Ser					
	380		385		390
Phe Asp Ser Gly Ile Gly Lys Asp Phe Glu Asp Gly Lys Leu Thr					
	395		400		405
Leu Glu Gln Val Tyr Glu Tyr Gly Lys Lys Asn Gly Glu Pro Lys					
	410		415		420
Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Leu Tyr Glu Ala Ile Val Ala Met					
	425		430		435
Tyr Gln					

<210> 2

<211> 1669

<212> DNA

<213> *Piromyces* sp.

<400> 2

gtaaattggct aaggaatatt tcccacaaat tcaaaagatt aagttcgaag gtaaggattc 60
taagaatcca ttagccttcc actactacga tgctgaaaag gaagtcattg gtaagaaaat 120
gaaggattgg ttacgtttcg ccatggcctg gtggcacact ctttgcgccg aaggtgctga 180

```

ccaattcggg ggaggtacaa agtctttccc atggaacgaa ggtactgatg ctattgaaat 240
tgccaagcaa aaggttgatg ctggtttcga aatcatgcaa aagcttggta ttccatacta 300
ctgtttccac gatgttgatc ttgtttccga aggtaactct attgaagaat acgaatccaa 360
ccttaagggt gtcgttgctt acctcaagga aaagcaaaag gaaaccggta ttaagcttct 420
ctggagtact gctaacgtct tcggtcacia gcgttacatg aacgggtgcct ccactaacc 480
agactttgat gttgtcgccc gtgctattgt tcaaattaag aacgccatag acgccgggat 540
tgaacttggg gctgaaaact acgtcttctg ggggtggctg gaagggttaca tgagtctcct 600
taacactgac caaaagcgtg aaaaggaaca catggccact atgcttacca tggctcgtga 660
ctacgctcgt tccaagggat tcaagggtag tttcctcatt gaaccaaagc caatggaacc 720
aaccaagcac caatacgatg ttgacactga aaccgctatt ggtttcctta aggccacaa 780
cttagacaag gacttcaagg tcaacattga agttaaccac gctactcttg ctggtcacac 840
tttcaaacac gaacttgcct gtgctgttga tgctggatg ctcggttcca ttgatgctaa 900
ccgtgggtgac taccaaaacg gttgggatac tgatcaattc ccaattgatc aatacgaact 960
cgtccaagct tggatggaaa tcatccgtgg tgggtggttc gttactggtg gtaccaactt 1020
cgatgccaaag actcgtcgta actctactga cctcgaagac atcatcattg cccacgtttc 1080
tggatggat gctatggctc gtgctcttga aaacgctgcc aagctcctcc aagaatctcc 1140
atacaccaag atgaagaagg aacgttacgc ttccttcgac agtgggtattg gtaaggactt 1200
tgaagatggg aagctcacc tcgaacaagt ttacgaatac ggtaagaaga acggtgaacc 1260
aaagcaaact tctggtaagc aagaactcta cgaagctatt gttgccatgt accaataagt 1320
taatcgtagt taaattggta aaataattgt aaaatcaata aacttgtcaa tcctccaatc 1380
aagtttaaaa gatcctatct ctgtactaat taaatatagt acaaaaaaaaa atgtataaac 1440
aaaaaaaaag ctaaaagacg gaagaattta atttagggaa aaaataaaaa taataataaa 1500
caatagataa atcctttata ttaggaaaat gtccattgt attattttca tttctactaa 1560
aaaagaaagt aaataaaaca caagaggaaa ttttcccttt tttttttttt tgtaataaat 1620
tttatgcaaa tataaatata aataaaataa taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1669

```

<210> 3

<211> 494

<212> PRT

<213> *Piromyces* sp.

<400> 3

Met	Lys	Thr	Val	Ala	Gly	Ile	Asp	Leu	Gly	Thr	Gln	Ser	Met	Lys
1				5					10					15
Val	Val	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Lys	Lys	Glu	Ile	Ile	Glu	Ser	Ala
				20					25					30
Ser	Cys	Pro	Met	Glu	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Asp	Gly	Thr	Arg	Glu
				35					40					45
Gln	Thr	Thr	Glu	Trp	Phe	Asp	Lys	Gly	Leu	Glu	Val	Cys	Phe	Gly
				50					55					60
Lys	Leu	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Lys	Thr	Ile	Glu	Ala	Ile	Gly	Ile
				65					70					75
Ser	Gly	Gln	Leu	His	Gly	Phe	Val	Pro	Leu	Asp	Ala	Asn	Gly	Lys
				80					85					90
Ala	Leu	Tyr	Asn	Ile	Lys	Leu	Trp	Cys	Asp	Thr	Ala	Thr	Val	Glu
				95					100					105
Glu	Cys	Lys	Ile	Ile	Thr	Asp	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Lys	Ala	Val
				110					115					120
Ile	Asp	Ala	Leu	Gly	Asn	Leu	Met	Leu	Thr	Gly	Phe	Thr	Ala	Pro
				125					130					135
Lys	Ile	Leu	Trp	Leu	Lys	Arg	Asn	Lys	Pro	Glu	Ala	Phe	Ala	Asn
				140					145					150
Leu	Lys	Tyr	Ile	Met	Leu	Pro	His	Asp	Tyr	Leu	Asn	Trp	Lys	Leu
				155					160					165
Thr	Gly	Asp	Tyr	Val	Met	Glu	Tyr	Gly	Asp	Ala	Ser	Gly	Thr	Ala
				170					175					180
Leu	Phe	Asp	Ser	Lys	Asn	Arg	Cys	Trp	Ser	Lys	Lys	Ile	Cys	Asp
				185					190					195
Ile	Ile	Asp	Pro	Lys	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Ile	Glu
				200					205					210

Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Lys	Val	Asn	Asp	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala			
				215					220								225
Tyr	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Asp			
				230					235								240
Asn	Met	Met	Gly	Ala	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Val	Ala	Asp	Gly	Phe			
				245					250								255
Leu	Thr	Met	Ser	Met	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Ser			
				260					265								270
Asp	Lys	Pro	Ile	Ser	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Phe	Cys			
				275					280								285
Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Trp	Leu	Pro	Leu	Leu	Cys	Thr	Met	Asn	Cys			
				290					295								300
Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Phe	Val	Arg	Asn	Leu	Phe	Gln	Met	Asp	Ile			
				305					310								315
Lys	Glu	Leu	Asn	Val	Glu	Ala	Ala	Lys	Ser	Pro	Cys	Gly	Ser	Glu			
				320					325								330
Gly	Val	Leu	Val	Ile	Pro	Phe	Phe	Asn	Gly	Glu	Arg	Thr	Pro	Asn			
				335					340								345
Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Ala	Ser	Ile	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Ala	Asn			
				350					355								360
Thr	Ser	Arg	Ala	Asn	Ile	Ala	Arg	Ala	Ser	Phe	Glu	Ser	Ala	Val			
				365					370								375
Phe	Ala	Met	Arg	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala	Phe	Arg	Lys	Leu	Gly	Phe			
				380					385								390
Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	Arg	Leu	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Lys	Ser	Asp			
				395					400								405
Leu	Trp	Arg	Gln	Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Met	Asn	Leu	Pro	Ile	Arg			
				410					415								420
Val	Pro	Leu	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Val	Gln			
				425					430								435

Ala	Leu	Trp	Cys	Leu	Lys	Asn	Gln	Ser	Gly	Lys	Cys	Asp	Ile	Val
				440					445					450
Glu	Leu	Cys	Lys	Glu	His	Ile	Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Ala
				455					460					465
Asn	Pro	Ile	Ala	Glu	Asn	Val	Ala	Val	Tyr	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
				470					475					480
Glu	Tyr	Cys	Lys	Val	Val	Asn	Thr	Leu	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ala	
				485					490					

<210> 4

<211> 2041

<212> DNA

<213> *Piromyces* sp.

<400> 4

```

attatataaa ataactttaa ataaaacaat ttttatttgt ttatttaatt attcaaaaaa 60
aattaaagta aaagaaaaat aatacagtag aacaatagta ataatatcaa aatgaagact 120
gttgctggta ttgatcttgg aactcaaagt atgaaagtcg ttattttacga ctatgaaaag 180
aaagaaatta ttgaaagtgc tagctgtcca atggaattga tttccgaaag tgacgggtacc 240
cgtgaacaaa ccactgaatg gtttgacaag ggtcttgaag tttgttttgg taagcttagt 300
gctgataaca aaaagactat tgaagctatt ggtatttctg gtcaattaca cggttttgtt 360
cctcttgatg ctaacggtaa ggcttttatac aacatcaaac tttggtgtga tactgctacc 420
gttgaagaat gtaagattat cactgatgct gccggtgggtg acaaggctgt tattgatgcc 480
cttggttaacc ttatgctcac cggtttcacc gtccaaaga tcctctggct caagcgcaac 540
aagccagaag ctttcgctaa cttaaagtac attatgcttc cacacgatta cttaaactgg 600
aagcttactg gtgattacgt tatggaatac ggtgatgcct ctggtaccgc tctcttcgat 660
tctaagaacc gttgctggtc taagaagatt tgcgatatca ttgacccaaa acttttagat 720
ttacttccaa agttaattga accaagcgct ccagctggta aggttaatga tgaagccgct 780
aaggcttacg gtattccagc cggtattcca gtttccgctg gtggtgggtga taacatgatg 840
ggtgctgttg gtactgggtac tgttgctgat ggtttcctta ccatgtctat ggggtacttct 900

```

ggtactcttt acggttacag tgacaagcca attagtgacc cagctaattgg ttttaagtgg 960
ttctgttctt ctactgggtg atggcttcca ttactttgta ctatgaactg tactgttgcc 1020
actgaattcg ttcgtaacct cttccaaatg gatattaagg aacttaatgt tgaagctgcc 1080
aagtctccat gtggtagtga aggtgtttta gttattccat tcttcaatgg tgaaagaact 1140
ccaaacttac caaacggtcg tgctagtatt actgggtctta cttctgctaa caccagccgt 1200
gctaacattg ctctgctag tttcgaatcc gccgttttcg ctatgctgg tggtttagat 1260
gctttccgta agttaggttt ccaaccaaag gaaattcgtc ttattggtgg tggttctaag 1320
tctgatctct ggagacaaat tgccgctgat atcatgaacc ttccaatcag agttccactt 1380
ttagaagaag ctgctgctct tgggtggtgct gttcaagctt tatggtgtct taagaaccaa 1440
tctggtaagt gtgatattgt tgaactttgc aaagaacaca ttaagattga tgaatctaag 1500
aatgctaacc caattgccga aaatgttgct gtttacgaca aggcttacga tgaatactgc 1560
aaggttgtaa atactctttc tccattatat gcttaaattg ccaatgtaaa aaaaaatata 1620
atgccatata attgccttgt caataactg ttcattgttca tataatcata ggacattgaa 1680
tttacaaggt ttatacaatt aatatctatt atcatattat tatacagcat ttcattttct 1740
aagattagac gaaacaattc ttggttcctt gcaatatata aaatttacat gaatttttag 1800
aatagtctcg tatttatgcc caataatcag gaaaattacc taatgctgga ttcttggttaa 1860
taaaaacaaa ataaataaat taaataaaca aataaaaatt ataagtaa ataaatatat 1920
aagtaatata aaaaaaagt aaataaataa ataaataaat aaaaattttt tgcaaatata 1980
taaataaata aataaatat aaaaataatt tagcaaataa attaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040
a 2041

REIVINDICAÇÕES

1. Célula hospedeira de *Saccharomyces* transformada com um construto de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificadora de uma xilose-isomerase, caracterizada pelo fato de compreender uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou suas sequências degeneradas que codificam a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, pela qual o construto de ácido nucleico ao transformar a célula hospedeira, confere à célula hospedeira a capacidade de crescer em xilose como fonte de carbono.

2. Célula hospedeira de *Saccharomyces* transformada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a levedura pertence a uma das espécies: *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum* e *S. diastaticus*.

3. Célula hospedeira de *Saccharomyces* transformada, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a sequência de nucleotídeos codificadora de uma xilose-isomerase está operacionalmente ligada a um promotor que causa expressão da xilose-isomerase na célula hospedeira, para conferir à célula hospedeira a capacidade de isomerizar xilose em xilulose.

4. Célula hospedeira de *Saccharomyces* transformada, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o promotor é insensível à repressão catabólica na célula hospedeira.

5. Célula hospedeira de *Saccharomyces* transformada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira

compreende uma modificação genética que consiste de sobreexpressão de um gene endógeno ou expressão de um gene heterólogo, e pela qual o gene é selecionado do grupo consistindo de um gene codificador de: um transportador de pentose ou hexose, uma xilulose-quinase; uma enzima da rota de pentose-fosfato, uma enzima glicolítica, e uma enzima etanologênica.

6. Célula hospedeira de *Saccharomyces* transformada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma modificação genética que consiste da inativação de um gene endógeno, através da qual o gene é selecionado do grupo consistindo de um gene codificador de um gene de hexose-quinase ou dos genes MIG1 e MIG2.

7. Célula hospedeira de *Saccharomyces* transformada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira expressa uma ou mais enzimas que conferem à célula hospedeira a capacidade de produzir ácido lático, ácido acético, ácido succínico, aminoácidos, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, antibióticos de β -lactama e cefalosporinas.

8. Processo para a produção de etanol, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) fermentar um meio contendo uma fonte de xilose com uma célula hospedeira de *Saccharomyces* transformada, como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, por meio do qual a célula hospedeira fermenta xilose a etanol; e opcionalmente,

(b) recuperar o etanol.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o meio também contém uma fonte de glicose.

Fig 1