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

(11) PI 0923653-8 B1

(22) Data do Depósito: 22/12/2009

(45) Data de Concessão: 13/10/2020

(54) Título: MÉTODO PARA CONVERTER ÁCIDO D-GALACTURÔNICO EM ÁCIDO MESOGALACTÁRICO, MÉTODO PARA TRATAR BIOMATERIAL COMPREENDENDO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO E CEPA HOSPEDEIRA MICROBIANA EUCARIÓTICA

(51) Int.Cl.: C12N 1/15; C12N 1/19; C12N 9/04; C12N 15/53; C12P 7/44.

(30) Prioridade Unionista: 23/12/2008 FI 20086236.

(73) Titular(es): TEKNOLOGIAN TUTKIMUSKESKUS VTT OY.

(72) Inventor(es): HANNU BOER; SATU HILDICH; PETER RICHARD; MERJA PENTTILÄ.

(86) Pedido PCT: PCT FI2009051029 de 22/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/072902 de 01/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/06/2011

(57) Resumo: CONVERSÃO DE ÁCIDO HEXURÔNICO EM ÁCIDO HEXÁRICO. A presente invenção refere-se a um método e cepa hospedeira microbiana para converter um ácido hexurônico em um ácido hexárico. Em particular, a invenção refere-se à conversão de ácido D-galacturônico em ácido meso-galactário (ácido múcico). A invenção também considera um sequência de nucleotídeos isolada. De acordo com o presente método, uma cepa hospedeira microbiana geneticamente modificada para expressar a enzima uronato desidrogenase (EC 1.1.1.203) é contatada com um biomaterial compreendendo ácido hexurônico e os produtos da conversão são recuperados. Usando os micro-organismos recombinantes da presente invenção é possível tratar biomaterias compreendendo ácidos hexurôicos e desse modo diminuir a quantidade de ácidos hexurônicos liberados ao ambiente.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA CONVERTER ÁCIDO D-GALACTURÔNICO EM ÁCIDO MESOGALACTÁRICO, MÉTODO PARA TRATAR BIOMATERIAL COMPREENDENDO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO E CEPA HOSPEDEIRA MICROBIANA EUCARIÓTICA".**

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a um método e cepa hospedeira microbiana para converter um ácido hexenurônico em um ácido hexárico. Em particular, a invenção refere-se à conversão de ácido D-galacturônico em ácido meso-galactárico (ácido múcico).

Descrição da Técnica Relacionada

[002] O material de resíduo biológico da indústria como a indústria de agricultura e polpa e celulose contém açúcares e seus derivados tais como açúcares ácidos. A conversão de tal resíduo em produtos úteis foi de interesse e um desafio no campo da biotecnologia por um longo tempo. O ácido D-galacturônico é o componente principal de pectina, um material bruto de baixo preço enriquecido, por exemplo, em polpa de beterraba e casca de frutas cítricas, e uma fonte de carbono para micro-organismos que vivem em material de planta em decomposição. O ácido D-glucurônico e o ácido D-manurônico são componentes, por exemplo, em materiais de madeira e algas.

[003] Há ao menos três vias diferentes conhecidas para o catabolismo de ácido D-galacturônico (D-galacturonato):

1) A via de isomerase que está presente, por exemplo, em *Escherichia coli*: Essa via consiste em cinco enzimas que convertem D-galacturonato em piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato.

2) A via oxidativa que está presente, por exemplo, em *Agrobacterium tumefaciens*: Nessa via bacteriana, o ácido D-galacturônico é primeiro oxidado em ácido meso-galactárico (ácido múcico). Isso foi descrito para *Pseudomonas* e para *Agrobacterium*

tumefaciens (figura 1). Uma desidrogenase dependente de NAD é induzida em células de *A. tumefaciens* cultivadas em ácido D-galacturônico. A enzima foi parcialmente purificada e mostrou atividade com ácido D-galacturônico e D-glucurônico (Chang e Feingold 1969).

3) A via eucariótica que está presente em *Aspergillus niger* e *Hypocrea jecorina* (figura 2) (anteriormente *Trichoderma reesei*): Na primeira etapa dessa via, o ácido D-galacturônico é reduzido para ácido L-galactônico por um NADPH utilizando redutase em *Hypocrea jecorina*, GAR1 (Kuorelahti e outros, 2005 e WO 2006/128965). A enzima é reversível e específica para NADPH. Em *Aspergillus niger*, uma redutase de ácido D-galacturônico, GAAA, foi identificado que poderia usar NADPH e NADH, entretanto, NADPH teve uma afinidade mais alta (Martens-Uzonova 2008). Um ortólogo do gene do *A. niger*, *gaaA*, existe também em *H. jecorina*, *gar2*, entretanto, de acordo com Martens-Uzonova (2008) não se sabe se é funcional.

[004] A polpa de beterraba e as cascas de frutas cítricas são atualmente secas e usadas como alimentação de gado. Entretanto, como a secagem consome muita energia, usos alternativos para o biomaterial compreendendo ácidos hexurônicos, em particular, ácido D-galacturônico, seriam desejáveis. Também na indústria de polpa e celulose, novos métodos de tratamento para fluxos adicionais compreendendo açúcares e açúcares ácidos são necessários.

[005] Como descrito acima, na via oxidativa, o ácido D-galacturônico é oxidado em ácido múcico em algumas bactérias. Entretanto, não há relatos de que essas bactérias poderiam ser usadas para a fermentação de ácido D-galacturônico em ácido múcico. A razão mais provável para isso é que o ácido múcico é imediatamente metabolizado.

[006] O ácido múcico é atualmente uma especialidade química. Ele é produzido a partir da galactose por oxidação com ácido nítrico.

Se produzido em baixo preço, ele tem o potencial de uso mais amplo. Ele é listado como um dos 30 produtos mais potenciais produzidos a partir de biomassa listados em um estudo da American NREL.

[007] Como o ácido D-galacturônico é um material bruto barato, que é enriquecido em polpa de beterraba e casca de frutas cítricas, um método para catabolizar ácido D-galacturônico (D-galacturonato) é necessário. Em particular, um método barato para produzir ácido múcico é necessário.

[008] Ademais, novos métodos para catabolizar outros ácidos hexáricos, tal como ácido D-glucurônico e ácido manurônico, são necessários.

Sumário da Invenção

[009] É um objetivo da presente invenção fornecer novos métodos e dispositivos para a utilização de biomateriais compreendendo açúcares, açúcares ácidos e seus derivados.

[0010] Outro objetivo da invenção é fornecer métodos e dispositivos para degradar e utilizar biomateriais compreendendo ácidos hexurônicos.

[0011] Um objetivo adicional da presente invenção é fornecer um método para catabolizar ácido D-galacturônico. Em particular, um objetivo da presente invenção é fornecer um método para degradar biomaterial compreendendo ácido D-galacturônico, tal como pectina.

[0012] Ainda um objetivo adicional da presente invenção é fornecer um método para converter ácido D-galacturônico em ácido múcico.

[0013] Um outro objetivo da invenção é fornecer um método para degradar e utilizar biomaterial compreendendo ácido D-glucurônico.

[0014] Um objetivo adicional da invenção é fornecer um método para degradar e utilizar biomaterial compreendendo ácido D-manurônico.

[0015] Ainda um objetivo adicional da presente invenção é fornecer um método para converter ácido D-glucurônico em ácido D-glucárico e/ou ácido D-manurônico em ácido D-manárico.

[0016] A presente invenção é baseada na ideia de que um hospedeiro microbiano pode ser geneticamente modificado para converter ácido hexenurônico em ácido hexárico. Isso pode ser alcançado introduzindo-se uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase (EC 1.1.1.203) na cepa hospedeira e expressando a dita sequência de nucleotídeo na cepa hospedeira. Uma cepa microbiana recombinante pode ser usada para degradar e utilizar biomateriais compreendendo ácidos hexurônicos.

[0017] De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, o hospedeiro é um hospedeiro eucariótico. Preferencialmente, o hospedeiro é um hospedeiro fungo, mais preferencialmente, um hospedeiro fungo filamentoso.

[0018] Ademais, de acordo com outra modalidade preferencial da invenção, um hospedeiro fungo naturalmente consumindo ácido hexenurônico, é geneticamente modificado tal que ele não possa mais consumi-lo. O hospedeiro fungo é geneticamente modificado para produzir a enzima uronato desidrogenase (EC 1.1.1.203) e o hospedeiro é capaz de oxidar ácido hexenurônico em ácido hexárico. Mais especificamente, o hospedeiro fungo é capaz de converter ácido D-galacturônico em ácido múcico. O hospedeiro fungo é também capaz de converter ácido D-glucurônico em ácido D-glucárico e ácido D-manurônico em ácido D-manárico.

[0019] Atualmente, o ácido múcico é produzido a partir de galactose por oxidação com ácido nítrico. O novo processo seria uma fermentação na qual somente ar é utilizado para a oxidação. O processo seria menos dispendioso, uma vez que nenhum produto químico é usado. O ácido galacturônico é menos dispendioso do que a

galactose. Com esse método, o ácido múcico pode se tornar um produto barato em escala industrial.

[0020] Usando os micro-organismos recombinantes da presente invenção, é possível tratar biomateriais compreendendo ácidos hexurônicos e desse modo diminuir a quantidade de ácidos hexurônicos liberados ao ambiente.

[0021] Outros objetivos,detalhes e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes a partir dos seguintes desenhos,descrição detalhada e exemplos.

Breve Descrição dos Desenhos

[0022] A figura 1 mostra a via bacteriana para o catabolismo de ácido D-galacturônico. Os primeiros três metabólitos são representados na projeção de Fischer. O C1 do meso-galactarato (ácido múcico) nesta representação é o C6 do 3-deóxi-2-ceto-L-treo-hexarato. Nessa via, a D-galacturonato desidrogenase e a 2,5-dioxovalerato desidrogenase estão usando NAD como um cofator.

[0023] A figura 2 mostra a via fúngica para o catabolismo de ácido D-galacturônico. Os metabólitos são representados na projeção de Fischer, o que significa que o C1 do D-galacturonato se torna o C6 do L-galactonato. A D-galacturonato redutase pode ser específica para sua exigência NADPH ou aceitação não específica NADH de NADPH dependente do organismo.

[0024] A figura 3 mostra o quadro de leitura aberta do gene *uro1* de *Agrobacterium tumefaciens*.

[0025] A figura 4 mostra a sequência de aminoácido codificada pelo gene *uro1*.

[0026] A figura 5 mostra o plasmídeo pRSET-A-53-pyrG_A.

[0027] A figura 6 mostra o ATCC1015-pyrG (cepa parental) e cepas mutantes (dois clones obtidos) foram cultivados em um meio na presença de ácido D-galacturônico a 2% como uma única fonte de

carbono. As cepas mutantes não foram capazes de se desenvolver sob essas condições.

[0028] A figura 7 mostra o plasmídeo GUDH_A-tum.

[0029] A figura 8 mostra o plasmídeo pCL2-Amf' ds+GU-DH.

[0030] A figura 9 mostra a sequência de nucleotídeo codificando uronato desidrogenase de Pseudomonas.

[0031] A figura 10 mostra a sequência de aminoácido codificada.

[0032] A figura 11 mostra o plasmídeo URO-DH.

[0033] A figura 12 mostra o plasmídeo pCL2-AMDS+URO-DH.

Descrição Detalhada das Modalidades Preferenciais

Definições

[0034] Em conjunto com a presente invenção, a expressão "enzima uronato desidrogenase" designa uma enzima classificada como EC 1.1.1.203 pela classificação de enzimas.

[0035] O ácido D-galacturônico (D-galacturonato) é conhecido por ser catabolizado através das seguintes vias:

1) Via bacteriana para o catabolismo de ácido D-galacturônico:

[0036] A via de isomerase que está presente, por exemplo, em Escherichia coli: Essa via consiste em cinco enzimas convertendo D-galacturonato em piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato. Os metabólitos intermediários são D-tagaturonato, D-altronato, 3-deóxi-D-eritro-hex-2-ulosonato e 3-deóxi-D-eritro -hex-2-ulosonato-6-fosfato. As enzimas são uronato isomerase (EC 5.3.1.12), D-tagaturonato redutase utilizando NADH (EC 1.1.1.5), altronato desidratase (EC 4.2.1.7), 3-deóxi-D-eritro-hex-2-ulosonato quinase (EC 2.7.1.45) e 3-deóxi-D-eritro-hex-2-ulosonato-6-fosfato aldolase (EC 4.1.2.14).

2) Via oxidativa para o catabolismo de ácido D-galacturônico em bactérias:

[0037] A via oxidativa que está presente, por exemplo, em *Agrobacterium tumefaciens*: Nesta via bacteriana, o ácido D-

galacturônico é primeiro oxidado em ácido meso-galactárico (ácido múcico). Isso foi descrito para *Pseudomonas* e para *Agrobacterium tumefaciens* (figura 1). Uma desidrogenase dependente de NAD é induzida em células de *A. tumefaciens* cultivadas em ácido D-galacturônico. A enzima parcialmente purificada mostrou atividade com ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico (Chang e Feingold 1969). O produto reacional imediato é provavelmente uma lactona de ácido galactárico (ou lactona de ácido D-glucárico), que hidrolisa espontaneamente. O produto reacional hidrolisado é, em geral, a forma mais estável; a reação reversa da D-galacturonato desidrogenase é consequentemente não observada. A reação reversa é somente observada em pH ácido onde a lactona de ácido galactárico está presente (Wagner e Hollman, 1976). O ácido meso-galactárico (ácido múcico) passa por uma desidratação na próxima etapa, e o produto reacional é ácido 3-deóxi-2-ceto-L-treo-hexárico (Chang e Feingold, 1970).

[0038] As seguintes etapas envolvem uma desidratação e descarboxilação e o produto reacional é 2-cetoglutarato semialdeído (2,5-dioxovalerato) (Chang e Feingold, 1970). A desidratação e a descarboxilação são executadas por uma única enzima (EC 4.2.1.41) que foi descrita em mais detalhes em *Pseudomonas acidovorans* (Jeffcoat 1975). 2-cetoglutarato semialdeído é subsequentemente oxidado em 2-cetoglutarato que é um metabólito em numerosas vias. Somente as atividades enzimáticas dessas enzimas foram descritas. Os genes correspondentes não foram identificados nem em *A. tumefaciens* nem em *P. acidovorans* ou em qualquer outro micro-organismo.

3) Via eucariótica para o catabolismo de ácido D-galacturônico em fungos:

[0039] A via eucariótica que está presente em *Aspergillus niger* e

em *Hypocrea jecorina* (figura 2): Na primeira etapa dessa via, o ácido D-galacturônico é reduzido em ácido L-galactônico por um NADPH utilizando redutase em *Hypocrea jecoria*, GAR1 (Kuorelahti e outros, 2005 e WO 2006/128965). A enzima é reversível e específica para NADPH. Em *Aspergillus niger*, uma redutase de ácido D-galacturônico, GAAA, que foi identificada poderia usar NADPH e NADH, entretanto, NADPH teve uma afinidade mais alta (Martens-Uzonova 2008). Um ortólogo de gene do *A. niger* gaaA existe também em *H. jecorina*, gar2, entretanto, não se sabe se ele é funcional (Martens-Uzonova 2008). A segunda enzima nessa via, uma desidratase, divide uma molécula de água de ácido L-galactônico para gerar 3-deóxi-L-treo-hex-2-ulosonato (ácido 2-ceto-3-deóxi-L-galactônico) (Kuorelahti e outros, 2006). Essa reação enzimática não é reversível. Uma deleção do gene correspondente, lgd1, no fungo filamentoso *H. jecorina* impediu o fungo filamentoso de se desenvolver em ácido D-galacturônico, entretanto, quando cultivado em uma fonte de carbono diferente, a cepa de deleção converteu D-galacturonato em L-galactonato (Kuorelahti e outros, 2006). A terceira enzima na via de ácido D-galacturônico é a 3-deóxi-L-treo-hex-2-ulosonato aldolase que está dividindo o substrato 3-deóxi-L-treo-hex-2-ulosonato em piruvato e L-gliceraldeído (Hilditch e outros, 2007). A deleção do gene para aldolase, lgd1, em *Hypocrea jecorina* resultou em uma cepa incapaz de se desenvolver em ácido D-galacturônico como uma fonte de carbono (Hilditch e outros, 2007), entretanto, quando cultivado em uma fonte de carbono diferente, o ácido D-galacturônico foi convertido em 3-deóxi-L-treo-hexulosonato (Hilditch e outros, 2007). O ácido L-galactônico não se acumulou provavelmente devido à atividade da L-galactonato desidratase. O piruvato pode ser metabolizado através de diferentes vias onde L-gliceraldeído não é um metabólito de qualquer via conhecida.

[0040] O L-gliceraldeído é convertido em glicerol pela quarta enzima da via, uma redutase dependente de NADPH. Uma codificação de gene para uma enzima com essa atividade foi identificada em *H. jecorina* (Liepins e outros, 2006). Essa enzima, GLD1 em *H. jecorina*, não foi reversível, isto é, a enzima purificada não exibiu atividade com glicerol e NADP. Martens-Uzonova analisaram o transcriptoma (a transcrição de todos os genes) no fungo filamentoso *A. niger*. Neste documento, diferentes fontes de carbono foram comparadas, incluindo o ácido D-galacturônico, ácido poli-galacturônico e polpa de beterraba. Notou-se que os quatro genes dessa via catabólica, aqui chamados gaaA, gaaB, gaaC e gaaD, foram induzidos durante o desenvolvimento em pectina e ácido D-galacturônico (Martens-Uzonova 2008). Além dos genes exigidos para o catabolismo e dos genes codificando para enzimas pectinolíticas, também 3 genes codificando para potenciais proteínas de transporte foram identificados como sendo induzidos. Sugeriu-se que essas proteínas transportadoras desempenhem uma função na ingestão de ácido D-galacturônico (Martens-Uzonova, 2008).

[0041] Por "uma sequência de nucleotídeo codificando uma desidrogenase de ácido urônico" entende-se que um gene codificando a dita enzima, ou uma forma encurtada ou modificada do dito gene sendo um equivalente funcional do dito gene.

[0042] Os termos "sequência de nucleotídeo", "sequência de ácido nucleico", e "molécula de DNA" incluem tanto genoma quanto cDNA.

[0043] Uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase EC 1.1.1.203 da presente invenção pode ser isolada de qualquer organismo produzindo essa enzima que compreende eucariotos incluindo animais (e homem), plantas, fungos, leveduras ou procariotos incluindo bactérias. Preferencialmente, uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase

da presente invenção é isolada de uma fonte microbiana, tal como de bactérias ou fungos, em particular, de bactérias.

[0044] De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase da presente invenção é obtida a partir do gênero *Agrobacterium*, mais preferencialmente, de *A. tumefaciens*. De acordo com uma modalidade mais preferencial da invenção, uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima é obtida a partir de uma cepa da coleção de cultura comercial C 58, ATCC, American Type Culture Collection. De acordo com outra modalidade preferencial da invenção, uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase é obtida a partir do gênero *Pseudomonas*. De acordo com uma modalidade mais preferencial da invenção, uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima está disponível como número de acesso ao GenBank EU377538.

[0045] A origem de uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase da presente invenção não está restrita ao gênero *Agrobacterium* ou à espécie *A. tumefaciens* nem está restrita ao gênero ou espécie de *Pseudomonas*. Usando a descrição fornecida aqui, uma pessoa versada na técnica pode encontrar e isolar uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase da presente invenção a partir de outros gêneros de bactérias ou fungos ou a partir de outros organismos.

[0046] Os organismos capazes de produzir a enzima uronato desidrogenase podem ser examinados, a atividade em vários substratos pode ser determinada, e a enzima caracterizada. As sequências de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase em vários organismos podem ser isoladas e as sequências de aminoácido codificadas pelas sequências de nucleotídeo podem ser comparadas com a sequência de aminoácido

da enzima uronato desidrogenase isolada e caracterizada nos Exemplos aqui fornecidos. Uma pessoa versada na técnica pode também identificar uma região conservada na sequência de nucleotídeo ou de aminoácido e clonar um fragmento de gene usando técnicas PCR. Após sequenciar o fragmento, o gene completo pode ser obtido, por exemplo, usando biblioteca de cDNA em um vetor como descrito por Richard e outros (2001). Uma sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase pode ser identificada também por hibridização de ácido nucleico.

[0047] Os métodos de biologia molecular padrão podem ser usados na clonagem da enzima uronato desidrogenase, isto é, no isolamento e tratamentos com enzima de DNA, em transformações de *E. coli*, no isolamento de um fragmento compreendendo o gene de uronato desidrogenase pela amplificação em uma reação PCR (Coen D M, 2001) e nas técnicas por mudança de códon. Os métodos básicos usados são descritos nos manuais de biologia molecular padrão, por exemplo, Sambrook e outros (1989) e Sambrook e Russel (2001). A inserção da sequência de nucleotídeo sob um forte promotor em um vetor de expressão, a transferência do vetor para células hospedeiras adequadas e o cultivo das células hospedeiras em condições provocam a produção da dita enzima. Os métodos para a produção de proteína por tecnologia recombinante em diferentes sistemas hospedeiros são bem-conhecidos na técnica (Gellissen, 2005).

[0048] Por "uma sequência de nucleotídeo homóloga" entende-se uma sequência de nucleotídeo que se origina da mesma espécie do hospedeiro. Por "sequência de nucleotídeo heteróloga" entende-se uma sequência de nucleotídeo de outra espécie diferente do hospedeiro e de outro gênero diferente do hospedeiro. Se o organismo hospedeiro é um hospedeiro procariótico, por exemplo, um hospedeiro

bacteriano, tal como *E. coli*, *Agrobacterium* ou *Pseudomonas*, a sequência de nucleotídeo codificando uronato desidrogenase pode ser homóloga. Se o organismo hospedeiro é um organismo eucariótico, por exemplo, um fungo, a sequência de nucleotídeo heteróloga pode significar uma sequência de nucleotídeo de um procarioto, tal como de bactérias.

[0049] É evidente que pequenas variações na sequência de nucleotídeo de um gene não mudam significativamente as propriedades catalíticas da proteína codificada. Por exemplo, muitas mudanças na sequência de nucleotídeo não mudam a sequência de aminoácido da proteína codificada. Também, uma sequência de aminoácido pode ter variações, que não mudam as propriedades funcionais de uma proteína, em particular, elas não impedem uma enzima de executar sua função catalítica. Tais variações na sequência de nucleotídeo ou nas moléculas de DNA ou na sequência de aminoácido são conhecidas como "equivalentes funcionais", porque elas não mudam significativamente a função do gene para codificar uma proteína com uma função particular, por exemplo, catalisar uma reação particular ou, respectivamente, mudar a função particular da proteína. Assim, tais equivalentes funcionais, incluindo fragmentos, da sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 3 ou 19, e da sequência de aminoácido SEQ ID NO: 4 ou 20, respectivamente, são abrangidos dentro do escopo da invenção.

[0050] Dentro do escopo da presente invenção estão também sequências de nucleotídeo que são capazes de hibridizar com as sequências identificadas sob condições de estringência intermediária ou alta. Por exemplo, as condições de hibridização de estringência intermediária podem ser executadas em uma mistura de hibridização contendo 6 x SSC (0,9 M de NaCl em 0,09 M de citrato de sódio, pH 7), 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 x solução de Denhardt e

100 µ/ml de DNA de esperma de arenque a 50º C. A hibridização sob alta estringência pode ser executada, por exemplo, na mesma mistura de hibridização a 68º C.

[0051] Pelo termo "identidade" entende-se a identidade entre duas sequências de aminoácido comparadas entre si a partir do primeiro aminoácido codificado pelo gene correspondente ao último aminoácido. A identidade das sequências de comprimento integral é medida usando o programa de alinhamento global Needleman-Wunsch no pacote de programa EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite; Rice e outros, 2000), versão 2.9.0, com os seguintes parâmetros: EMBLOSUM62, Gap penalty 10,0, Extend penalty 0,5.

[0052] Dentro do escopo da presente invenção estão enzimas ou polipeptídeos que compreendem sequências de aminoácido que têm atividade de uronato desidrogenase e que mostram ao menos 65% de identidade com a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 20. As enzimas preferenciais compreendem sequências de aminoácido que mostram ao menos 70%, mais preferencialmente ao menos 75%, ainda mais preferencialmente ao menos 80% de identidade. Ainda mais preferencialmente, as sequências de aminoácido mostram ao menos 85%, mais preferencialmente ao menos 90%, ainda mais preferencialmente ao menos 95%, mais preferencialmente ao menos 98% de identidade com a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 20.

[0053] De acordo com uma modalidade preferencial da presente invenção, uma sequência de nucleotídeo codificando uronato desidrogenase é identificada e expressa em um micro-organismo hospedeiro. O hospedeiro pode ser um hospedeiro procariótico ou eucariótico. Preferencialmente, o hospedeiro é eucariótico, mais preferencialmente, um hospedeiro fúngico, mais preferencialmente um

hospedeiro fúngico filamentoso. A sequência de nucleotídeo codificando uronato desidrogenase codifica preferencialmente uronato desidrogenase da via oxidativa para o catabolismo de ácido urônico de bactérias.

[0054] A invenção não está restrita a fungos filamentosos ou leveduras geneticamente modificados. A sequência de ácido nucleico codificando a enzima uronato desidrogenase pode ser expressa em qualquer organismo, tal como bactérias, plantas ou eucariotos maiores aplicando as ferramentas genéticas adequadas e conhecidas na técnica para esse organismo particular.O micro-organismo poderia portanto ser interpretado amplamente para incluir também células de organismos maiores.

[0055] A presente invenção foi exemplificada identificando e expressando uma sequência de nucleotídeo codificando desidrogenase de ácido urônico em um micro-organismo fúngico. O organismo recombinante se mostrou capaz de converter ácido D-galacturônico em ácido múcico (ácido meso-galactárico) e ácido D-glucurônico em ácido sacárico (ácido D-glucárico). A sequência de nucleotídeo codificando desidrogenase de ácido urônico era de origem bacteriana.

[0056] A expressão de uronato desidrogenase em um hospedeiro fúngico é de vantagem, como muitos hospedeiros fúngicos, em particular, fungos filamentosos, produzem enzimas pectinolíticas. Os hospedeiros fúngicos adequados são cepas hospedeiras, por exemplo, dos gêneros *Fusarium, Aspergillus* e *Hypocrea* (anteriormente *Trichoderma*), preferencialmente *Aspergillus* e *Hypocrea*. Mais especificamente, as cepas hospedeiras adequadas pertencem à espécie *H. jecorina* ou *A. niger*. A produção de enzimas pectinolíticas facilitariam a produção de ácido D-galacturônico a partir de pectina.

[0057] Os sistemas hospedeiros de produção e expressão

adequados são, por exemplo, o sistema de produção desenvolvido para o hospedeiro fungo *Trichoderma* (EP 244 234) (espécie de *Hypocrea* anteriormente classificado como *Trichoderma*), ou sistema de produção de *Aspergillus*, tal como *A. oryzae* ou *A. niger* (WO 9708325 e WO 9533836, US 5.843.745, US 5.770.418), ou o sistema de produção desenvolvido por *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier e outros, 1989).

[0058] A clonagem de genes codificando para a uronato desidrogenase em duas espécies diferentes de fungos filamentosos e uma levedura foi exemplificada nos exemplos. A mesma abordagem pode ser usada com outros fungos filamentosos, leveduras ou qualquer micro-organismo.

[0059] O organismo hospedeiro da presente invenção precisa estar naturalmente utilizando ácidos hexurônicos. Para impedir a via natural de competir por ácido hexenurônico, as vias conflitantes podem ser nocauteadas. A sequência de nucleotídeo codificando a enzima pode ser inativada, por exemplo, impedindo-se sua expressão ou por mutação ou deleção da sequência de codificação. Essas técnicas tipicamente fazem uso da sequência de nucleotídeo da sequência de codificação ou da sequência de nucleotídeo adjacente à sequência de codificação. A sequência de codificação da enzima pode ser inativada em qualquer micro-organismo tendo a dita sequência de nucleotídeo.

[0060] O nocaute de uma via natural para utilização de ácido D-galacturônico pode ser feito, por exemplo, deletando-se a redutase de ácido D-galacturônico.

[0061] É, portanto, ainda outra modalidade desta invenção que em adição à expressão heteróloga de uronato desidrogenase, a via endógena para catabolismo de hexuronato seja interrompida. A interrupção dessa via catabólica foi exemplificada deletando-se redutase de ácido D-galacturônico, mais especificamente o gene *gar1*

em *H. jecorina* e o gene *gaaA* em *Aspergillus niger*. Esses dois genes têm uma baixa homologia de sequência e diferentes propriedades cinéticas. O gene *gaaA* tem um homólogo próximo chamado *gar2* em *H. jecorina* (Martens-Uzonova 2008). Por causa da redundância de sequências homólogas, foi inesperado que a única deleção de *gar1* ou *gaaA* fosse suficiente para interromper o catabolismo. Outro resultado inesperado foi que mutantes da deleção de *gar1* e *gaaA* sobrevivem na presença de ácido D-galacturônico. Poder-se-ia esperar que tal deleção levasse o ácido D-galacturônico a ser tóxico, similar a uma deleção de *pgi1* em *S. cerevisiae*. Na levedura *S. cerevisiae,* o gene *pgi1* codifica a fosfofructo isomerase, cuja deleção resulta em toxicidade de glicose. O produto reacional imediato da desidrogenase de ácido urônico é provavelmente a galactarato lactona (Wagner e Hollman, 1976). A lactona é hidrolisada em galactarato espontaneamente; entretanto, deve ser vantajoso coexpressar a lactonase que facilitaria a hidrólise da lactona.

[0062] Se a uronato desidrogenase é expressa em um hospedeiro, que não está naturalmente utilizando ácidos hexurônicos, não há necessidade de nocaute das vias conflitantes. Entretanto, aqui o transporte de ácido hexenurônico para a célula precisa desacelerar a conversão de ácidos hexurônicos em ácidos hexáricos. Se, por exemplo, a desidrogenase de ácido D-galacturônico é expressa em um hospedeiro, que não está naturalmente utilizando ácido D-galacturônico, não há necessidade de nocaute das vias conflitantes. Aqui, o transporte de ácido D-galacturônico para a célula precisa desacelerar a conversão de ácido D-galacturônico em ácido múcico. Nesse caso, a expressão de genes codificando as moléculas de transporte de ácido D-galacturônico pode facilitar a conversão de ácidos urônicos.

[0063] Por exemplo, se o hospedeiro é levedura, tal como *S.*

cerevisiae, recomenda-se a introdução de um transportador para facilitar o transporte de ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico e/ou ácido D-manurônico ou para a célula.

[0064] A atividade enzimática do uronato desidrogenase foi descrita anteriormente por Chang e Feingold (1969) e referências citadas aqui. Chang e Feingold (1969) descreveram uma desidrogenase dependente de NAD parcialmente purificada, que tinha atividade com ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico.

[0065] Na presente descrição, identificou-se um procedimento diferente para a purificação da enzima. Nessa descrição, usou-se a técnica de digestão tríptica da proteína purificada e a subsequente análise MALDI-ToF para identificar os tamanhos dos fragmentos de proteína. Como a sequência genômica desse organismo era conhecida, o conhecimento dos fragmentos de proteína possibilitou a identificação do gene correspondente. Acredita-se que uma sequência de gene codificando uma uronato desidrogenase foi descrita aqui pela primeira vez. Há uma entrada no banco de dados de sequência NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov) com o número de acesso ao GenBank EU377538 que descreve uma uronato desidrogenase a partir de *Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000 com o número EC 1.1.1.203. Essa entrada no banco de dados não continha quaisquer detalhes adicionais para substanciar que o gene era de fato uma uronato desidrogenase.

[0066] Dentro do escopo da presente invenção estão também construções genéticas compreendendo um vetor adequado que pode ser usado quando a sequência de ácido nucleico codificando a enzima uronato desidrogenase é introduzida em um hospedeiro. Na construção, a sequência de nucleotídeo é tipicamente operável ligada a regiões reguladoras que facilitam a expressão da sequência de nucleotídeo, tal como uma sequência promotora e uma sequência

sinal. O vetor pode ser, por exemplo, um vírus, tal como um bacteriófago ou um plasmídeo.

[0067] Nos exemplos, promotores fortes e constitutivos foram usados para a expressão da uronato desidrogenase. Outros promotores mais ou menos fortes ou promotores regulados podem ser usados.

[0068] O biomaterial adequado para a invenção é biomassa compreendendo açúcar, açúcares ácidos ou derivados desses, em particular, compreendendo ácidos hexurônicos. O biomaterial adequado é, por exemplo, polpa de beterraba, que compreende pectina. Também outros materiais compreendendo pectina podem ser usados. Outros biomateriais adequados são efluentes e fluxos adicionais da indústria de polpa e celulose ou biomaterial compreendendo algas.

[0069] De acordo com uma modalidade da invenção, no método de converter ácido hexenurônico em ácido hexárico, uma cepa hospedeira microbiana geneticamente modificada para expressar a enzima uronato desidrogenase (EC 1.1.1.203) é contatada com um biomaterial compreendendo ácido hexenurônico de modo a converter ao menos uma parte do ácido hexenurônico em ácido hexárico. Os produtos da conversão são recuperados.

[0070] Assim, de acordo com essa modalidade, a biomassa compreendendo um açúcar ácido ou um derivado dele é fermentada por um micro-organismo capaz de converter ácido hexenurônico em ácido hexárico e os compostos desejados produzidos são recuperados.

[0071] Em outra modalidade, a presente invenção é direcionada a um método, que compreende cultivar um micro-organismo geneticamente modificado sob condições que permitem a expressão da proteína na presença de ácidos hexurônicos.

[0072] A presente invenção também compreende métodos para recuperação da proteína de enzima ou recuperação dos produtos da conversão.

[0073] A invenção não está restrita à oxidação de ácido D-galacturônico em ácido múcico. O ácido D-glucurônico, bem como o ácido D-manurônico, que é o componente principal de alginato, pode ser oxidado em ácido D-glucárico e ácido D-manárico respectivamente.

[0074] A enzima uronato desidrogenase pode ser usada cultivando-se o organismo hospedeiro em um substrato compreendendo ácidos hexurônicos, tal como ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico ou ácido D-manurônico. As condições de cultura podem ser feitas adequadas para o desenvolvimento e proliferação do organismo hospedeiro.

[0075] A invenção é ainda direcionada a uma preparação enzimática compreendendo a enzima uronato desidrogenase. Tal preparação pode ser um extrato celular bruto do organismo geneticamente modificado, um meio de cultura gasto ou a enzima pode ser ainda purificada a partir do extrato celular ou do meio de cultura, sendo que a preparação compreende ao menos a enzima na forma purificada. A preparação pode também compreender outras enzimas que tomam parte no catabolismo de açúcares, ou açúcares ácidos ou seus derivados.

[0076] A enzima uronato desidrogenase pode ser usada como uma preparação enzimática. O termo "preparação enzimática" denota aqui qualquer produto enzimático, que contém ao menos a enzima uronato desidrogenase. Assim, tal preparação enzimática pode ser um meio de cultura gasto ou filtrado contendo um ou mais uronato desidrogenase opcionalmente com outras enzimas, uma enzima uronato desidrogenase isolada ou uma mistura de uma ou mais enzimas uronato desidrogenase. Em adição à atividade de uronato

desidrogenase, tal preparação pode conter aditivos, tal como componentes mediadores, estabilizadores, tampões, conservantes, tensoativos e/ou meio de cultura. Os aditivos preferenciais são tais que são geralmente usados em preparações enzimáticas destinadas para a aplicação, onde a preparação enzimática é usada. A preparação enzimática pode estar na forma de líquido, pó ou granulado.

[0077] A preparação enzimática pode compreender em adição ao uronato desidrogenase, uma ou mais outras enzimas, que podem ser, por exemplo, enzimas pectinolíticas, amilases e/ou celulases. Alternativamente, antes, durante ou após o tratamento com uronato desidrogenase da presente invenção, outro tratamento enzimático pode ser executado.

[0078] A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos não limitantes. Dever-se-ia entender, entretanto, que as modalidades dadas na descrição acima e no exemplo são para propósitos ilustrativos somente, e que várias mudanças e modificações são possíveis dentro do escopo das reivindicações.

Exemplo 1

[0079] Clonagem e expressão da desidrogenase de ácido D-galacturônico em um hospedeiro heterólogo.

[0080] Uma cepa de coleção de cultura comercial CS58 de *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) foi cultivada em um meio mínimo contendo ácido D-galacturônico. As células foram lisadas por sonicação e o extrato de proteína foi então ligado a uma coluna DEAE e eluídas com um gradiente linear de sal. As frações foram testadas quanto à atividade de desidrogenase de ácido D-galacturônico usando ácido D-galacturônico e reação NAD como os substratos pela medição da produção de NADH pela seguinte absorção a 340 nm. As frações ativas foram concentradas e aplicadas a um PAGE não desnaturado. Após a separação, a fração ativa foi

identificada usando a técnica de zimograma.

[0081] As frações ativas foram identificadas e separadas em um SDS-PAGE. Uma proteína na faixa de 32 kDa foi identificada como a desidrogenase de ácido D-galacturônico. A faixa de proteína foi cortada a partir do gel, digerida com tripsina e os peptídeos resultantes foram analisados usando MALDI TOF. As seguintes massas de peptídeo foram obtidas: 665.4160, 966.4224, 1020.4779, 1029.5153, 1407.4625, 1720.6669, 1740.7902 e 2082.9321. Essas massas de peptídeo foram então usadas para identificar o gene correspondente no genoma de *A. tumefaciens*. O quadro de leitura aberto foi então amplificado por PCR introduzindo sítios de restrições EcoRI e BamHI. Os seguintes iniciadores foram usados 5'-CACAGCAAAGACGCAGAATTCGCTTGGAAG-3' (SEQ ID NO: 1) e 5'-GGCTTGGGATCCCGCTGATCATTCAGCTC-3' (SEQ ID NO: 2). O gene foi chamado *uro1* e a sequência do quadro de leitura aberto é SEQ ID NO: 3 na listagem de sequência. A sequência SEQ ID NO: 3 codifica a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 4.

[0082] O produto de PCR foi então ligado a um vetor TOPO (Invitrogen). O fragmento EcoRI-BamHI foi liberado do vetor TOPO e ligado a um vetor de expressão de levedura. O vetor de expressão era um vetor de expressão de multicópias para *S. cerevisiae* contendo o URA3 para a seleção e o promotor TPI constitutivo. O plasmídeo foi derivado do plasmídeo pYX212 (R&D Systems); ele foi modificado para ter um sítio de restrição BamHI nos múltiplos sítios de clonagem. O vetor derivado foi transfectado para a cepa *de Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK.

Exemplo 2

Caracterização da atividade enzimática

[0083] A cepa de *S. cerevisiae* resultante do Exemplo 1 foi então desintegrada por agitação em vórtice com esferas de vidro e o extrato

de levedura analisado quanto à atividade de ácido D-galacturônico. Em um experimento de controle, uma cepa similar, mas com um plasmídeo vazio foi usada. Para realizar o ensaio da atividade de desidrogenase de ácido D-galacturônico, o extrato celular bruto foi misturado com 0,5 mM de NAD e 4 mM de ácido D-galacturônico em um tampão de 50 mM de Tris pH 7,5 contendo 0,5 mM de $MgCl_2$. A atividade foi 0,12 unidade por mg de proteína extraída. Uma unidade é a atividade que forma 1 µmol de produto por minuto. Na cepa de controle, nenhuma atividade poderia ser detectada.

Exemplo 3

Caracterização da desidrogenase de ácido D-galacturônico marcada com histidina purificada

[0084] A desidrogenase de ácido D-galacturônico com uma etiqueta de histidina na extremidade N-terminal foi produzida de uma maneira similar ao Exemplo 1, exceto que a etiqueta de histidina foi introduzida por PCR. Para introduzir a etiqueta de histidina, os seguintes iniciadores foram usados

5'-
CCGGAATTCACCATGCACCACCATCACCATCACATGGCGATGAAA
CGGCTTCTTG- 3' (SEQ ID NO:5) na direção senso e

5'- GGCTTGGGATCCCGCTGATCATTCAGCTC- 3' (SEQ ID NO:6) na direção antissenso.

[0085] Após a expressão da proteína marcada com histidina em *S. cerevisiae* como descrito no Exemplo 1, a atividade foi medida como descrito no Exemplo 2. A proteína marcada com histidina exibiu a mesma atividade da proteína não marcada no extrato de levedura. A desidrogenase de ácido D-galacturônico marcada com histidina foi então purificada usando um Ni-NTA-agarose (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A enzima purificada forneceu uma única faixa em um SDS PAGE.

[0086] A proteína estava ativa com ácido D-galacturônico e com ácido D-glucurônico (GIcUA).

[0087] A proteína purificada foi então usada para estimar as constantes Michaelis-Menten. Para ácido D-galacturônico, um Km de 0,5 mM e um Vmax de 124 unidades por mg de proteína (Km (GIcUA) = 1,1 mM Vmax (GIcUA 221 unidades por mg de proteína) e para NAD um Km de 0,9 mM e um Vmax de 145 unidades por mg de proteína foram estimados.

Exemplo 4

Deleção da redutase de ácido D-galacturônico em *H. jecorina*.

[0088] Para a deleção do gene *gar1*, um cassete de deleção foi construído. Para obter o cassete de deleção, áreas de DNA genômico de 1,5 kb de ambos os lados do gene de redutase de ácido D-galacturônico foram clonadas por PCR a partir de DNA genômico de *H. jecorina*. Os seguintes iniciadores foram usados:

gar1 5f:
GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGAAGCTTATATCCACCG TGTCCCAG (SEQ ID NO: 7)

gar1 5r:
ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACGACGCAGTTGTTTGAGC AAC (SEQ ID NO: 8)

gar1 3f:
CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACTTGCATTGGTCAGAGCG GTA (SEQ ID NO: 9)

gar1 3r:
GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCAAGCTTAAGCAGTGGA TGACTTGCTG (SEQ ID NO: 10)

[0089] Os outros elementos para a construção do cassete de deleção foram o gene *hph* (higromicina B fosfotransferase) sob o promotor *Aspergillus trpC* e os elementos para replicação e seleção

em levedura e *E. coli*. O fragmento contendo *hph* foi obtido por PCR usando o pCSN44 como um modelo e usando os seguintes iniciadores:

hphF GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC (SEQ ID NO: 11)

hphR GTTGGAGATTTCAGTAACGTTAAGTGGAT (SEQ ID NO: 12)

para produzir um fragmento de PCR de 1,447 bp.

[0090] O fragmento para replicação e seleção em *S. cerevisiae* e *E. co*li foi obtido digerindo-se o pRS426 com as enzimas de restrição EcoRI e Xhol para liberar um fragmento de 5,7 kb. Os dois fragmentos obtidos por PCR que continham as regiões de flanqueamento para recombinação homóloga foram combinados com os outros fragmentos. Todos os quatro fragmentos de DNA foram então transformados na cepa de *S. cerevisiae* FY834. O único plasmídeo obtido através da recombinação de homólogos foi isolado a partir da cepa de *S. cerevisiae* e amplificado em *E. coli*. pCSN44, pRS426 e FY834 foram obtidos a partir de Jay C. Dunlap. O cassete de deleção, 4520 bp contendo as regiões de flanqueamento *gar1* e a resistência à higromicina B, foi então liberado por digestão de *HindIII* e transformado na cepa de *H. jecorina* QM6a. Os transformantes foram selecionados quanto à resistência à higromicina. As cepas com uma deleção bem-sucedida foram identificadas por PCR de colônia. Para testar se as cepas mutantes foram ainda capazes de catabolizar ácido D-galacturônico, um experimento de cultivo foi executado. A cepa QM6a e a cepa mutante foram cultivadas em um meio na presença e ausência de ácido D-galacturônico a 1% como descrito anteriormente (Kuorelahti e outros, 2006). Após inocular 107 esporos por 50 ml, a cepa QM6a produziu uma massa seca de aproximadamente 3 g/l na presença e aproximadamente 0,24 g/l na ausência de ácido D-galacturônico após 5 dias de incubação. As cepas mutantes produziram 0,4 a 0,6 g/l na presença de ácido D-galacturônico e

aproximadamente 0,24 g/l na ausência de ácido D-galacturônico sob condições similares.

Exemplo 5

Expressão da desidrogenase de ácido D-galacturônico de *A. tumefaciens* na cepa de deleção de redutase de ácido D-galacturônico de *H. jecorina*.

[0091] Uma cepa de deleção *gar1* do exemplo 4 foi usada para expressar a desidrogenase de ácido D-galacturônico *uro1* de *A. tumefaciens* do exemplo 1. O fragmento BamHI contendo o *uro1* foi liberado do vetor TOPO descrito no Exemplo 1 e o gene *uro1* foi ligado ao sítio *BamHI* do vetor pAN53-1NotI modificado descrito por Kuorelahti e outros, 2006. Verificou-se que a orientação do *uro1* foi adequada para a transcrição. O plasmídeo resultante foi então cotransformado na cepa de deleção *gar1* com um plasmídeo de seleção pTOC202 que tem o gene amdS de *A. nidulans* codificando para a acetamidase como um marcador. Os transformantes foram selecionados quanto ao desenvolvimento na presença de acetamida. Os transformantes foram também verificados por PCR e por teste do extrato bruto do micélio para a atividade de desidrogenase de ácido D-galacturônico. A atividade nos transformantes foi 1,3 a 1,5 nKat por mg de proteína extraída. Na cepa de controle, nenhuma atividade foi detectada. Os transformantes foram também usados para um experimento de fermentação para converter ácido D-galacturônico em ácido múcico. Para esse propósito, cepas mutantes e de controle foram testadas como descrito no Exemplo 4, exceto que o meio continha D-xilose a 1% em adição ao ácido D-galacturônico a 1%. D-xilose foi adicionado para permitir que as cepas se desenvolvessem uma vez que a cepa mutante era incapaz de se desenvolver em ácido D-galacturônico. Após 3 dias, as cepas mutantes expressando o *uro1* produziram entre 1 e 1,3 g/l de ácido múcico, enquanto a cepa de

controle, que somente continha a cepa de deleção *gar1*, não produziu quantidades detectáveis de ácido múcico.

Exemplo 6

Deleção da desidrogenase de ácido D-galacturônico de *Aspergillus niger*

[0092] Para a deleção do gene GaaA em *Aspergillus niger*, um cassete de deleção foi construído. Para obter o cassete de deleção, áreas de 1,5 kb de DNA genômico de ambos os lados do gene de desidrogenase de ácido D-galacturônico foram clonadas por PCR a partir de DNA genômico de *A. niger*. Os seguintes iniciadores foram usados:

gaaA-5-F: TATACTCGAGTGAATTGCACTCTTCGTACCG (SEQ ID NO: 13)

gaaA-5-R: TATACCATGGTGTGATTGCTGTGGTGTAAAT (SEQ ID NO: 14)

gaaA-3-F: TATACCATGGCCGTTTATGATTCTGGTCCATC (SEQ ID NO: 15)

gaaA-3-R: TATAGAATTCTCGAGTTAATTCCCTTAGCG (SEQ ID NO: 16)

[0093] O outro elemento para a construção do cassete de deleção foi o gene *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilase) de *Aspergillus niger*. O fragmento *pyrG* contendo seu próprio promotor e terminador foi obtido por PCR a partir de DNA genômico de *A. niger*. Os seguintes iniciadores foram usados:

pyrG-del-F_n: TATACCCGGGTGATTGAGGTGATTGGCGAT (SEQ ID NO: 17)

pyrG-del-R_n: TATACCCGGGTTATCACGCGACGGACAT (SEQ ID NO: 18)

[0094] Os fragmentos de deleção *GaaA* (regiões de flanqueamento *gaaA*) foram primeiro inseridos no vetor pRSET (sítios

XhoI-EcoRI) por abordagem de clonagem de restrição e ligação convencional. O fragmento de DNA *pyrG* foi inserido no sítio *NcoI* (Klenow polimerase e fosfatase antártica tratada) criado entre os dois fragmentos de deleção *gaaA*. O construto resultante (figura 3) foi confirmado por digestão de restrição e sequenciamento. O cassete de deleção, 4854 bp contendo as regiões de flanqueamento *gaaA* e o gene *pyrG*, foi então liberado pela digestão com *NheI* e transformado em uma cepa de *A. niger* onde o gene *pyrG* foi deletado.

[0095] Os transformantes foram selecionados quanto ao desenvolvimento na ausência de uracila. As cepas com uma deleção bem-sucedida foram identificadas por PCR. Para testar se as cepas mutantes foram ainda capazes de catabolizar ácido D-galacturônico, um experimento de cultivo foi executado. As cepas ATCC1015-pyrG (cepa parental) e as cepas mutantes (dois clones obtidos) foram cultivadas em um meio na presença de ácido D-galacturônico a 2% como uma única fonte de carbono. As cepas mutantes não foram capazes de se desenvolver sob essas condições (figura 4).

Exemplo 7

[0096] Expressão da desidrogenase de ácido D-galacturônico de *A. tumefaciens* na cepa de deleção de redutase de ácido D-galacturônico de *A. niger*.

[0097] A cepa de deleção *gaaA* do exemplo 6 foi usada para expressar a desidrogenase de ácido D-galacturônico de *A. tumefaciens uro1*. O gene *uro1* foi códon otimizado para a expressão em *A. niger*. O fragmento *Apa*I-*Ecl*136II do plasmídeo p-GU-DH (figura 6) contendo o gene *uro1* foi ligado aos sítios *Apa*I-*Spe*I (preenchido com Klenow) do vetor pCL2 modificado contendo o gene *amdS* de *A. nidulans* como um marcador de seleção. O plasmídeo resultante (figura 7) foi então transformado na cepa de deleção *gaaA*. Os transformantes foram selecionados quanto ao desenvolvimento na

presença de acetamida como uma única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram também verificados por PCR e por teste do extrato bruto do micélio quanto à atividade de desidrogenase de ácido D-galacturônico. O extrato bruto dos transformantes mostrou atividade de desidrogenase de ácido D-galacturônico, enquanto na cepa de controle nenhuma atividade foi detectada. Os transformantes foram também usados para um experimento de fermentação para converter ácido D-galacturônico em ácido múcico. Para esse propósito, cepas mutantes e de controle foram testadas como descrito no exemplo 5. Após 3 dias, as cepas mutantes expressando o *uro1* produziram ácido múcico, enquanto a cepa de controle, que somente continha a cepa de deleção *gaaA*, não produziu quantidades detectáveis de ácido múcico.

Exemplo 8

Expressão de uronato desidrogenase de *Pseudomonas*

[0098] A codificação de DNA para uronato desidrogenase foi sintetizada por GE-NEART. Os códigos para o mesmo aminoácido como o gene com o número de acesso ao GenBank EU377538. A sequência de DNA está na Listagem de Sequência SEQ ID NO: 19. Ela codifica para a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 20.

[0099] O quadro de leitura aberto foi liberado por digestão com *Nco*I e *Spe*I. O fragmento resultante foi então ligado aos sítios *Nco*I e *Nhe*I do pYX212 (R&D Systems), que é um vetor de expressão de levedura multicópias com o promotor PGK1 e o marcador de seleção URA3. O vetor resultante foi então transfectado para a cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK como no exemplo 1. A atividade enzimática foi então testada como no Exemplo 2. A uronato desidrogenase mostrou atividade com NAD e ácido D-galacturônico e com NAD e ácido D-glucurônico.

Exemplo 9

[00100] Expressão de um gene transportador para ácido D-

galacturônico em *S. cerevisiae* em combinação com a expressão de uronato desidrogenase.

[00101] Para a expressão de um transportador de ácido D-galacturônico em *S. cerevisiae*, um gene codificando para um transportador de ácido D-galacturônico de *Aspergillus niger* (Martens-Uzonova, 2008) foi sintetizado e um vetor para a expressão em *S. cerevisiae* foi construído. O plasmídeo resultante foi transformado na cepa de levedura já contendo o uronato desidrogenase de *Agrobacterium tumefaciens* ou de *Pseudomonas*. A fermentação na presença de ácido D-galacturônico resultou na produção de ácido múcico.

Exemplo 10

[00102] Expressão de uronato desidrogenase de *Pseudomonas* na cepa de deleção de redutase de ácido D-galacturônico de *A. niger*.

[00103] A cepa de deleção *gaaA* do exemplo 6 foi usada para expressar o uronato desidrogenase de *Pseudomonas* (do exemplo 8). O gene foi códon otimizado para a expressão em A. niger. O fragmento *Apa*I-*Spe*I do plasmídeo p-URO-DH (figura 7) contendo o gene de uronato desidrogenase foi ligado aos sítios *Apa*I-*Spe*I do vetor pCL2 modificado contendo o gene *amdS* de *A. nidulans* como um marcador de seleção. O plasmídeo resultante (figura 8) foi então transformado na cepa de deleção *gaaA*. Os transformantes foram selecionados quanto ao desenvolvimento na presença de acetamida como uma única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram também verificados por PCR e testando o extrato bruto do micélio quanto à atividade de desidrogenase de ácido D-galacturônico. O extrato bruto dos transformantes mostrou atividade de desidrogenase de ácido D-galacturônico, enquanto na cepa de controle nenhuma atividade foi detectada. Os transformantes foram também usados para um experimento de fermentação para converter ácido D-galacturônico em

ácido múcico. Para esse propósito, as cepas mutantes e de controle foram testadas como descrito no Exemplo 5. Após 3 dias, as cepas mutantes expressando o uronato desidrogenase produziram ácido múcico enquanto a cepa de controle, que somente continha a cepa de deleção *gaaA*, não produziu quantidades detectáveis de ácido múcico.

Referências:

Chang YF, Feingold DS (1969) Hexuronic acid dehydrogenase of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 99: 667 - 673.

Chang YF, Feingold DS (1970) D-glucaric acid and galactaric acid catabolism by *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 102: 85 - 96.

Coen D.M. 2001 The polymerase chain reaction, published in Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, More D D, Seidman J G, Smith K. and Struhl K (eds.) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, USA)

Gellissen G, (ed). 2005. Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.. Weinheim, Alemanha.

Hilditch S, Berghäll S, Kalkkinen N, Penttilä M, Richard P (2007) The missing link in the fungal D-galacturonate pathway: identification of the L-threo-3-deoxy-hexulosonate aldolase. J Biol Chem. 282: 26195 - 26201.

Jeffcoat R (1975) Studies on the subunit structure of 4-deoxy-5-oxoglucarate hydro-lyase (decarboxylating) from *Pseudomonas acidovorans*. Biochem J. 145: 305 - 309.

Kuorelahti S, Jouhten P, Maaheimo H., Penttilä M, Richard P (2006) L-galactonate dehydratase is part of the fungal path for D-galacturonic acid catabolism. Mol. Microbiol. 61: 1060 - 1068.

Kuorelahti S, Kalkkinen N, Penttilä M, Londesborough J,

Richard P (2005) Identification in the mold *Hypocrea jecorina* of the first fungal D-galacturonic acid reductase. Biochemistry 44: 11234 - 11240.

Liepins J, Kuorelahti S, Penttilä M, Richard P (2006) Enzymes for the NADPH-dependent reduction of dihydroxyacetone and D-glyceraldehyde and L-glyceraldehyde in the mould *Hypocrea jecorina*. Febs J. 273: 4229 - 4235.

Malardier L, MJ Daboussi, J Julien, F Roussel, C Scazzocchio and Y Brygoo. 1989. Gene 15: 147 - 156.

Martens-Uzonova E (2008) Assessment of the pectinolytic network of *Aspergillus niger* by functional genomics. Insight from the transcriptome. In. PhD thesis, University of Wageningen, Wageningen.

Richard e outros (2001) J. Biol. Chem. 276: 40631 - 40637.

Wagner G, Hollmann S (1976) Uronic acid dehydrogenase from *Pseudomonas syringae*. Purification and properties. Eur J Biochem. 61: 589 - 596.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para converter ácido D-galacturônico em ácido mesogalactárico, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- contatar uma cepa hospedeira microbiana eucariótica geneticamente modificada para expressar a enzima uronato desidrogenase apresentando sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 ou 20, em que a cepa apresenta o gene endógeno da ácido D-galacturonico redutase deletado; e

- recuperar os produtos de conversão compreendendo ácido mesogalactárico.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro é um hospedeiro fúngico naturalmente capaz de degradar pectina.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro pertence ao gênero *Aspergillus* ou *Hypocrea*.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro é uma levedura hospedeira, preferencialmente pertencente ao gênero *Saccharomyces*.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro expressa uma sequência heteróloga, preferencialmente uma sequência de nucleotídeo bacteriana codificando a enzima uronato desidrogenase apresentando sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 ou 20.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a sequência de nucleotídeo codificando a enzima uronato desidrogenase apresentando sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 ou 20 se origina do gênero *Pseudomonas* ou *Agrobacterium*.

7. Método para tratar biomaterial compreendendo ácido D-galacturônico, caracterizado pelo fato de que uma etapa onde a cepa hospedeira microbiana eucariótica geneticamente modificada para expressar a enzima uronato desidrogenase apresentando sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 ou 20 e apresentando o gene endógeno do ácido D-galactouronico redutase deletado, é contatada com o dito biomaterial sob condições de cultura adequadas.

8. Cepa hospedeira microbiana eucariótica, caracterizada pelo fato de que a cepa hospedeira foi geneticamente modificada para expressar a enzima uronato desidrogenase apresentando sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 ou 20 e apresentando o gene endógeno do ácido D-galactouronico redutase deletado, a dita cepa hospedeira é capaz de converter ácido D-galacturônico em ácido mesogalactárico.

9. Cepa hospedeira microbiana eucariótica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro é um hospedeiro fúngico, preferencialmente um hospedeiro fúngico sendo naturalmente capaz de degradar pectina.

10. Cepa hospedeira microbiana eucariótica, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro pertence ao gênero *Aspergillus* ou *Hypocrea*.

11. Cepa hospedeira microbiana eucariótica, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro é uma levedura hospedeira, preferencialmente pertencente ao gênero *Saccharomyces*.

12. Cepa hospedeira microbiana eucariótica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro foi geneticamente modificado para expressar uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência de codificação da sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 19.

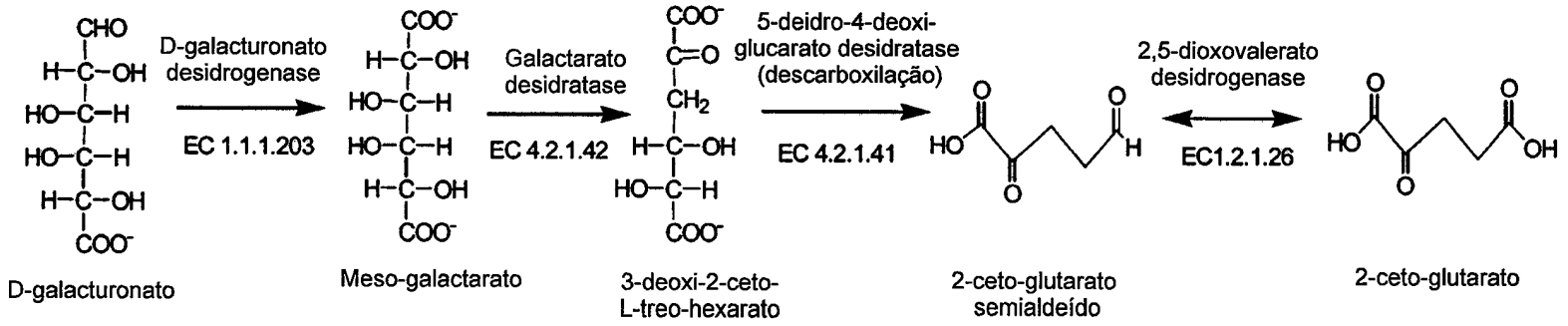

D-galacturonato
D-galacturonato desidrogenase
EC 1.1.1.203
Meso-galactarato
Galactarato desidratase
EC 4.2.1.42
3-deoxi-2-ceto-L-treo-hexarato
5-deidro-4-deoxi-glucarato desidratase (descarboxilação)
EC 4.2.1.41
2-ceto-glutarato semialdeído
2,5-dioxovalerato desidrogenase
EC1.2.1.26
2-ceto-glutarato

Fig.1

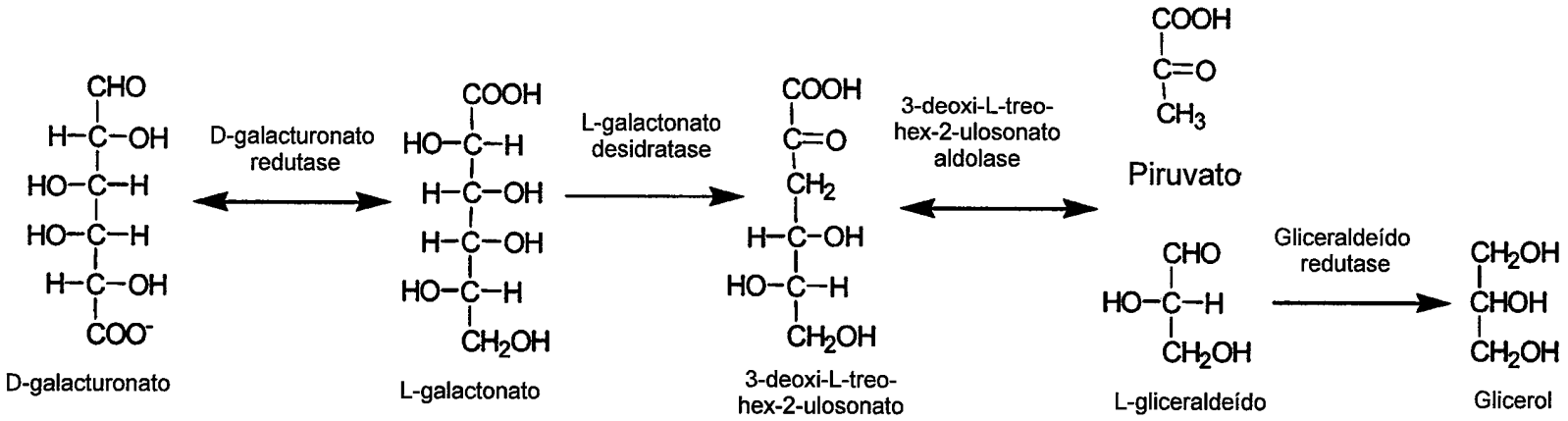

D-galacturonato
D-galacturonato redutase
L-galactonato
L-galactonato desidratase
3-deoxi-L-treo-hex-2-ulosonato
3-deoxi-L-treo-hex-2-ulosonato aldolase
Piruvato
L-gliceraldeído
Gliceraldeído redutase
Glicerol

Fig.2

ATGGCGATGAAACGGCTTCTTGTTACCGGTGCGGCGGGCCAGCTTGGCCGCGTCATGCGC
GAGCGTCTCGCACCGATGGCGGAGATACTGCGCCTTGCCGATCTCTCCCCGCTCGACCCG
GCAGGGCCGAACGAAGAATGCGTGCAATGCGACCTTGCCGATGCCAATGCCGTGAATGCC
ATGGTCGCCGGTTGCGACGGTATTGTTCATCTCGGCGGCATCTCGGTGGAGAAGCCCTTC
GAACAAATCCTTCAGGGCAATATCATCGGGCTTTATAATCTCTACGAGGCCGCCCGCGCC
CATGGACAGCCACGCATCGTCTTTGCCAGCTCCAACCACACGATCGGCTATTATCCGCAG
ACCGAACGGCTCGGTCCGGATGTTCCGGCGCGGCCGGACGGTCTTTACGGCGTCTCCAAA
TGTTTCGGCGAAAACCTCGCCCGCATGTATTTCGATAAATTCGGGCAGGAGACGGCGCTG
GTGCGCATCGGCTCCTGTACGCCGGAACCCAACAATTACCGCATGCTGTCCACCTGGTTT
TCGCACGATGATTTCGTGTCGCTGATCGAGGCGGTGTTTCGCGCGCCGGTGCTCGGCTGC
CCGGTCGTCTGGGGGGCATCGGCCAATGATGCGGGCTGGTGGGACAATTCGCATCTTGGC
TTTCTGGGCTGGAAACCGAAGGATAATGCCGAGGCCTTCCGGCGGCATATAACCGAGACG
ACACCGCCACCGGACCCGAATGACGCGTTGGTGCGGTTCCAGGGCGGTACGTTTGTCGAC
AACCCGATCTTCAAACAGAGC

Fig.3

MAMKRLLVTGAAGQLGRVMRERLAPMAEILRLADLSPLDPAGPNEECVQCDLADANAVNAMVAGCDGIVHLGGISVEKPFEQIL
QGNIIGLYNLYEAARAHGQPRIVFASSNHTIGYYPQTERLGPDVPARPDGLYGVSKCFGENLARMYFDKFGQETALVRIGSCTPE
PNNYRMLSTWFSHDDFVSLIEAVFRAPVLGCPVVWGASANDAGWWDNSHLGFLGWKPKDNAEAFRRHITETTPPPDPNDALV
RFQGGTFVDNPIFKQS

Fig. 4

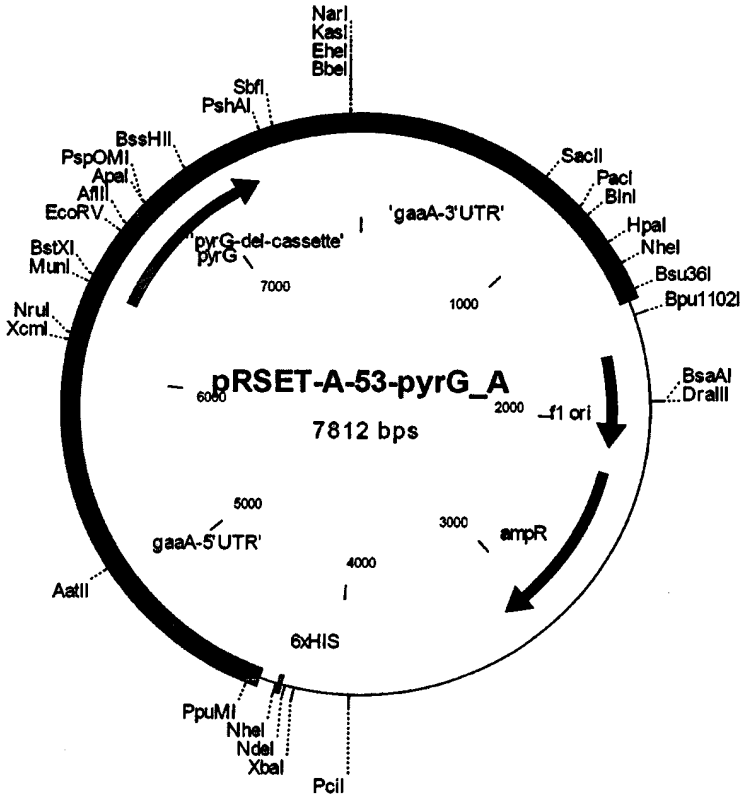

NarI
KasI
EheI
BbeI
SbfI
PshAI
BssHII
PspOMI
ApaI
AflII
EcoRV
BstXI
MunI
NruI
XcmI
SacII
PacI
BlnI
HpaI
NheI
Bsu36I
Bpu1102I
BsaAI
DraIII
'gaaA-3'UTR'
'pyrG-del-cassette'
pyrG
7000
1000
pRSET-A-53-pyrG_A
6000
2000
f1 ori
7812 bps
5000
gaaA-5'UTR'
3000
ampR
4000
AatII
6xHIS
PpuMI
NheI
NdeI
XbaI
PciI

Fig.5

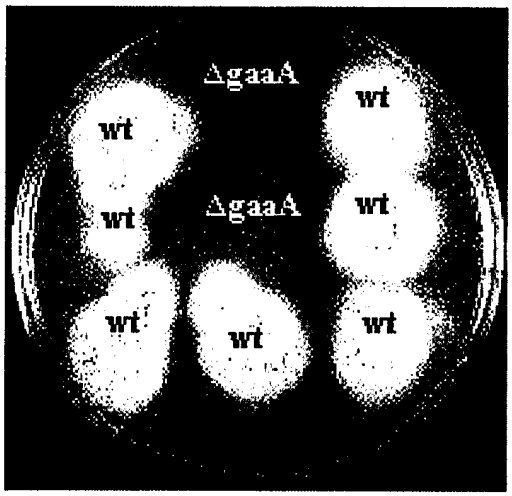

ΔgaaA
wt
wt
ΔgaaA
wt
wt
wt
wt
wt

Fig. 6

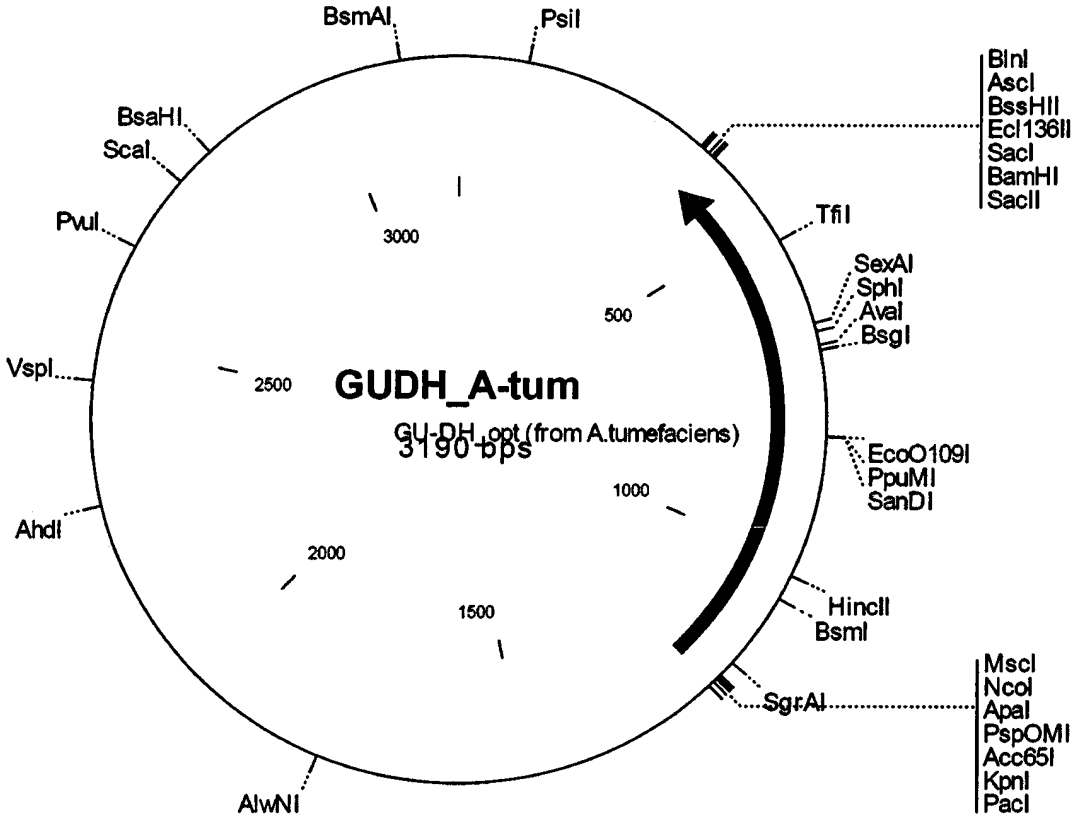

BsmAI
PsiI
BlnI
AscI
BssHII
Ecl136II
SacI
BamHI
SacII
BsaHI
ScaI
PvuI
TfiI
SexAI
SphI
AvaI
BsgI
VspI
GUDH_A-tum
GU-DH_opt (from A.tumefaciens)
3190 bps
EcoO109I
PpuMI
SanDI
AhdI
HincII
BsmI
MscI
NcoI
ApaI
PspOMI
Acc65I
KpnI
PacI
SgrAI
AlwNI
500
1000
1500
2000
2500
3000

Fig. 7

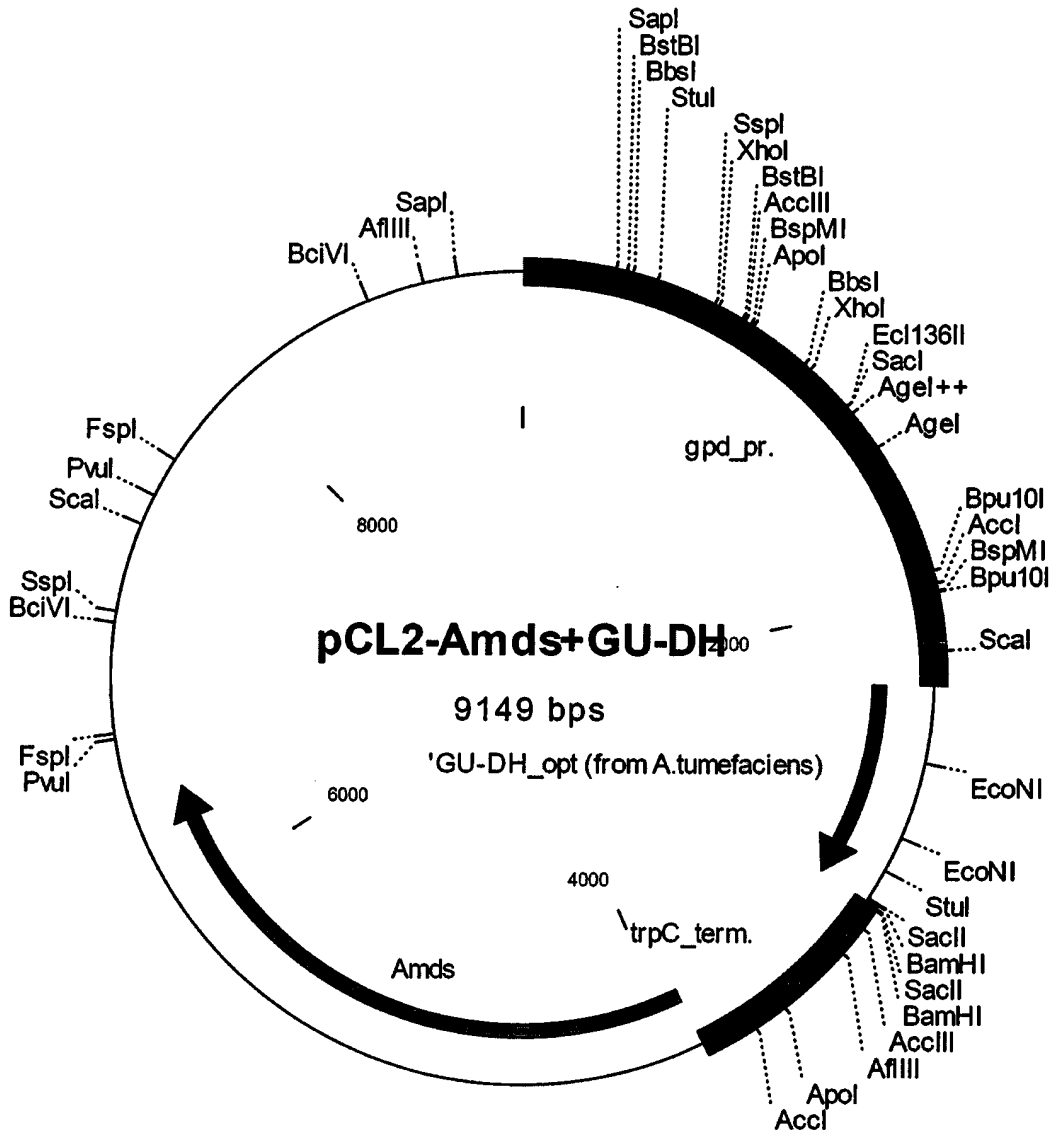

SapI
BstBI
BbsI
StuI
SspI
XhoI
BstBI
AccIII
BspMI
ApoI
BbsI
XhoI
Ecl136II
SacI
AgeI++
AgeI
Bpu10I
AccI
BspMI
Bpu10I
ScaI
EcoNI
EcoNI
StuI
SacII
BamHI
SacII
BamHI
AccIII
AflIII
ApoI
AccI
SapI
AflIII
BciVI
FspI
PvuI
ScaI
SspI
BciVI
FspI
PvuI
pCL2-Amds+GU-DH
9149 bps
'GU-DH_opt (from A.tumefaciens)
gpd_pr.
trpC_term.
Amds
2000
4000
6000
8000

Fig. 8

```
CAAGGCCTAGGCGCGCCATGAGCTCGGATCCGGGCCCATGGCCTCCGCCCACACCACCCA
GACCCCCTTCAACCGCCTCCTCCTCACCGGCGCTGCTGGCGGCCTCGGCAAGGTCCTCCG
CGAAACCCTCCGCCCCTACTCCCACATCCTCCGCCTCTCCGATATCGCCGAGATGGCCCC
TGCCGTCGGCGATCACGAGGAAGTCCAGGTCTGCGATCTCGCCGATAAGGATGCCGTCCA
CCGCCTCGTCGAGGGCGTCGATGCCATCCTCCACTTCGGCGGTGTTAGCGTCGAGCGCCC
CTTCGAGGAAATCCTCGGCGCCAACATCTGCGGCGTGTTCCACATCTACGAGGCCGCTCG
CCGTCATGGTGTCAAGCGCGTCATCTTCGCCTCCAGCAACCACGTCATCGGCTTCTACAA
GCAGAACGAAACCATCGATGCCCACTCCCCACGCCGCCCTGATTCCTACTACGGCCTCTC
CAAGTCCTACGGCGAGGATATGGCCTCCTTCTACTTCGATCGCTACGGCATCGAAACCGT
GTCCATCCGCATCGGCTCCAGCTTCCCCGAGCCCCAGAACCGCCGCATGATGTCCACCTG
GCTGTCCTTCGATGATCTCACCCGCCTGCTCGAGCGCGCCCTCTACACCCCCGATGTCGG
CCACACCGTCGTCTACGGCGTGTCCGATAACAAGACCGTCTGGTGGGATAACCGATTCGC
TTCTAAGCTCGATTACGCCCCCAAGGATTCCTCCGAGGTGTTCCGCGCCAAGGTGGACGC
TCAGCCCATGCCTGCTGATGATGATCCTGCTATGGTCTACCAGGGTGGTGCCTTCGTCGC
CTCCGGCCCCTTCGGCGATAAGTAAACTAGTGGATCCGGTACCTCTTAATTAACTGGCCT
C
```

Fig. 9

MASAHTTQTPFNRLLLTGAAGGLGKVLRETLRPYSHILRLSDIAEMAPAVGDHEEVQ
VCDLADKDAVHRLVEGVDAILHFGGVSVERPFEEILGANICGVFHIYEAARRHGVKR
VIFASSNHVIGFYKQNETIDAHSPRRPDSYYGLSKSYGEDMASFYFDRYGIETVSIRIGS
SFPEPQNRRMMSTWLSFDDLTRLLERALYTPDVGHTVVYGVSDNKTVWWDNRFAS
KLDYAPKDSSEVFRAKVDAQPMPADDDPAMVYQGGAFVASGPFGDK

Fig. 10

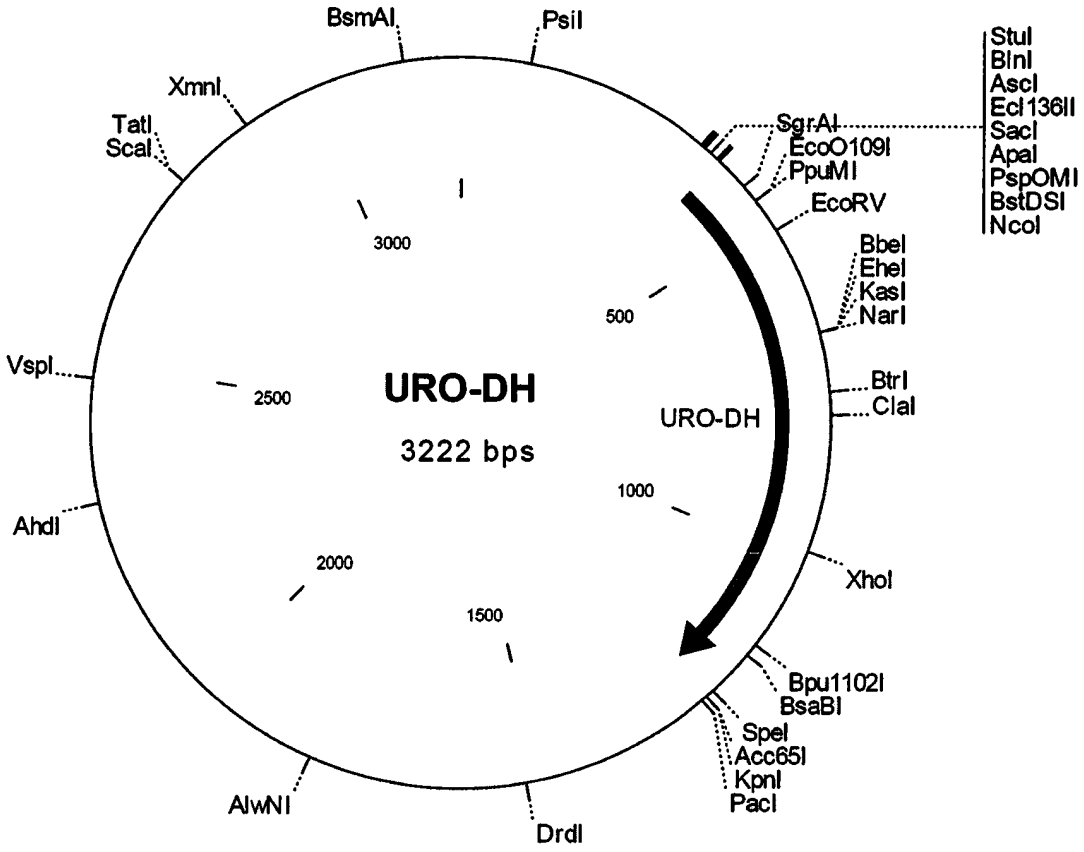

BsmAI
PsiI
XmnI
TatI
ScaI
VspI
AhdI
AlwNI
DrdI
SgrAI
EcoO109I
PpuMI
EcoRV
BbeI
EheI
KasI
NarI
BtrI
ClaI
XhoI
Bpu1102I
BsaBI
SpeI
Acc65I
KpnI
PacI
StuI
BlnI
AscI
Ecl136II
SacI
ApaI
PspOMI
BstDSI
NcoI
URO-DH
3222 bps
URO-DH
500
1000
1500
2000
2500
3000

Fig. 11

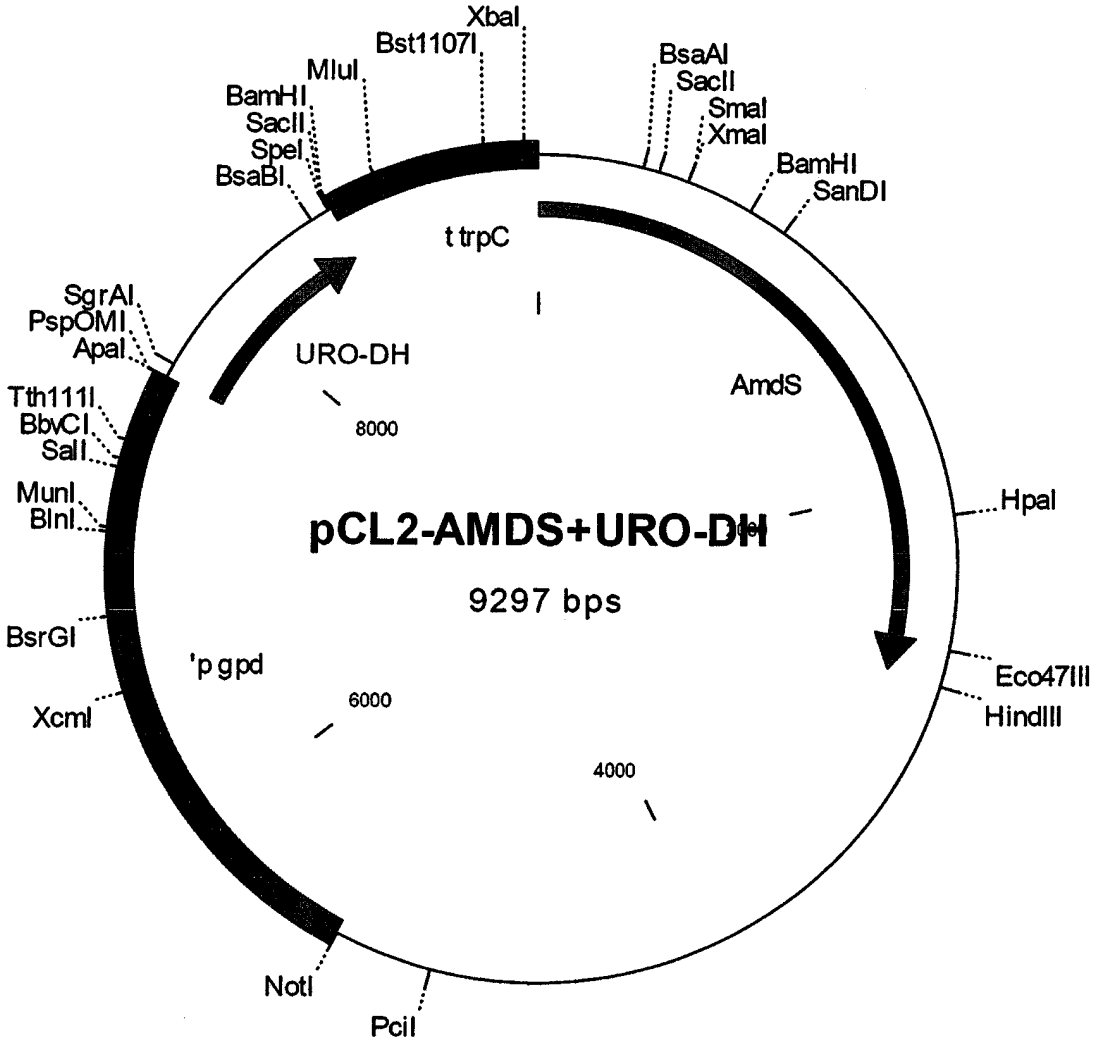

Xbal
Bst1107I
MluI
BamHI
SacII
SpeI
BsaBI
BsaAI
SacII
SmaI
XmaI
BamHI
SanDI
t trpC
SgrAI
PspOMI
ApaI
URO-DH
AmdS
Tth111I
BbvCI
SalI
8000
MunI
BlnI
pCL2-AMDS+URO-DH
9297 bps
HpaI
BsrGI
'p gpd
Eco47III
HindIII
6000
XcmI
4000
NotI
PciI

Fig. 12