



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0913845-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0913845-5

(22) Data do Depósito: 01/07/2009

(43) Data da Publicação do Pedido: 07/01/2010

(51) Classificação Internacional: C12N 5/10; C12N 15/81; C12P 7/10; C12R 1/645; C12N 9/92; C12P 19/24.

(30) Prioridade Unionista: DE 10 2008 031 350.5 de 02/07/2008.

(54) Título: USO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA HOSPEDEIRA ISOLADA, SEU USO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL E DE UM PRODUTO DE METABOLIZAÇÃO

(73) Titular: LESAFFRE ET COMPAGNIE. Endereço: 41, RUE ETIENNE MARCEL PARIS F-75001, FRANÇA(FR)

(72) Inventor: DAWID BRAT; ECKHARD BOLES; MARCO KELLER; BEATE WIEDEMANN.

Código de Controle: 1168BF46729B861C 037E741D11AC18E5

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 01/07/2009, observadas as condições legais

Expedida em: 04/12/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA HOSPEDEIRA ISOLADA, USO DA MESMA E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL E DE UM PRODUTO DE METABOLIZAÇÃO"**.

5 A presente invenção refere-se ao uso de moléculas de ácido nucleico que codificam uma xilose isomerase bacteriana (XI), preferencialmente proveniente de *Clostridium phytofermentans*, para a conversão/metabolização, particularmente fermentação, de biomaterial contendo xilose com micro-organismos recombinantes, e particularmente
10 para a produção de bioalcoóis, particularmente bioetanol, por meio de leveduras fermentadoras de xilose. A presente invenção refere-se ainda a células, particularmente células eucarióticas, que são transformadas com um construto de expressão de ácido nucleico, que codifica para uma xilose isomerase (XI), em que a expressão do construto de expressão de ácido
15 nucleico transmite às células a capacidade de isomerizar diretamente xilose em xilulose. As ditas células são preferencialmente utilizadas para a conversão/metabolização, particularmente fermentação, de biomaterial contendo xilose, e particularmente para a produção de bioalcoóis, particularmente bioetanol. A presente invenção também refere-se a métodos
20 para a produção de bioetanol, e a métodos para a produção de produtos adicionais de metabolização, compreendendo a metabolização de meios contendo xilose.

Antecedentes da invenção

25 Graças à sua capacidade de fermentar açúcar em etanol e dióxido de carbono, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* fermentadora de cerveja, vinho e de padeiro já foi usada por séculos para produção de pão, vinho e cerveja. Com exceção da produção de proteínas heterólogas, *S. cerevisiae* é usada em biotecnologia principalmente na produção de etanol para fins industriais. Em numerosas indústrias, o etanol é usado como um
30 substrato inicial para sínteses. Devido às reservas de óleo cada vez menores, aumento dos preços do óleo e necessidade global continuamente crescente por petróleo, o etanol está se tornando cada vez mais importante

Segue-se folha 1a/33

como um combustível alternativo.

Para permitir uma produção econômica e eficiente de bioetanol,

Segue-se folha 2/33

o uso de biomassa contendo lignocelulose, tal como, por exemplo, palha, dejetos da indústria madeireira e agricultura e a proporção orgânica do refugo doméstico diário, é uma opção principal como um substrato inicial. Por um lado, é muito econômica e, por outro lado, disponível em grandes quantida-

5 dades. Os três principais componentes de lignocelulose são lignina, celulose e hemicelulose. Hemicelulose, após celulose, o segundo polímero de maior ocorrência, é um heteropolímero altamente ramificado. Consiste em pentoses (L-arabinose, D-xilose), ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-D-glicurônico, ácido D-galacturônico) e hexoses (D-manose, D-galactose, L-ramnose, D-

10 glicose) (ver figura 1). Mesmo que hemicelulose possa ser mais facilmente hidrolisada do que celulose, caracteriza as pentoses L-arabinose e D-xilose, que normalmente não podem ser convertidas pela levedura *S. cerevisiae*.

Por serem capazes de usar pentoses para fermentações, inicialmente têm que entrar na célula através da membrana plasmática. Embora

15 *S. cerevisiae* não seja capaz de metabolizar D-xilose, pode absorvê-la na célula. Entretanto, *S. cerevisiae* não possui nenhum transportador específico. O transporte realiza-se por meio dos numerosos transportadores de hexose. Entretanto, a afinidade dos transportadores de D-xilose é apreciavelmente menor do que aquela para D-glicose (Kotter and Ciriacy, 1993). Em

20 leveduras, que podem metabolizar D-xilose, tais como, por exemplo, *P. stipitis*, *C. shehatae* ou *P. tannophilus* (Du Preez et al., 1986), tanto os transportadores de baixa afinidade não específicos, que transportam D-glicose como simpórteres protônicos de alta afinidade específicos somente para D-xilose estão presentes (Hahn-Hägerdahl et al., 2001).

25 *Utilização de D-xilose*

Diferentes bactérias, leveduras e fungos são capazes de metabolizar xilose. Em procariotos e eucariotos, a metabolização de xilose diferencia-se principalmente no tipo de isomerização de xilose em xilulose. Em procariotos, a conversão de xilose em xilulose realiza-se por meio da enzima

30 xilose isomerase (XI). Em eucariotos, a xilose é na maior parte isomerizada em duas etapas. Inicialmente, a xilose é reduzida a xilitol pela xilose redutase (XR) dependente de NAD(P)H e convertida ainda em xilulose pela xilitol

desidrogenase (XDH) dependente de NAD. A reação de fosforilação subsequente realiza-se em procariotos e eucariotos por meio da xiluloquinase (XK).

5 O intermediário resultante xilulose-5-fosfato é um intermediário da via pentose fosfato. A principal parte de xilulose-5-fosfato introduz a glicólise na forma de frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato e é nele posteriormente convertido em piruvato (Schaaff-Gerstenschläger and Miosga, 1997). Sob condições fermentativas, o açúcar é degradado posteriormente em etanol pela piruvato descarboxilase e pela álcool desidrogenase. Sob 10 condições aeróbicas, o piruvato pode ser oxidado em dióxido de carbono no ciclo de citrato por meio de uma série de etapas de reação.

Utilização de D-xilose em S. cerevisiae

Em artigos de Köotter e Ciriacy (1993), uma cepa de *S. cerevisiae* recombinante, que foi capaz de metabolizar D-xilose foi construída pela 15 primeira vez. Para isto, os genes da levedura *Pichia stipitis* que codifica para D-xilose redutase (*XYL1*) e xilitol desidrogenase (*XYL2*) foram expressos heterologamente na levedura *S. cerevisiae*. Em trabalhos posteriores, a xiluloquinase endógena (*XKS1*) foi adicionalmente superexpressa, que melhorou a absorção de D-xilose na célula bem como sua conversão em etanol 20 (Ho *et al.*, 1998; Eliasson *et al.*, 2000). Apesar das melhorias alcançadas, o principal subproduto da conversão de xilose sob condições limitantes de oxigênio foi xilitol. Isto é atribuído a um desequilíbrio no equilíbrio redox, que é causado pela reação que inicialmente se realiza na via metabólica preferencialmente usando NADPH, entretanto, a segunda reação que produz sozinha 25 NADH (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Sob condições aeróbicas, o NADH formado pela xilitol desidrogenase pode ser regenerado a NAD através da cadeia respiratória. Sob condições anaeróbicas, NAD não pode ser regenerado e resulta em acúmulo de NADH nas células. Sem o cofator NAD, o xilitol da xilitol desidrogenase não pode ser convertido posteriormente à xilulose.

30 Embora a xilose redutase usada no artigo mencionado se origine de *P. stipitis*, que é capaz de usar também NADH como um cofator, além de NADPH (Metzger and Hollenberg, 1995), resulta na alteração da fermenta-

ção de xilose sob condições anaeróbicas estritas.

Uma solução para o problema foi introduzir uma via metabólica redox-neutra em *S. cerevisiae*. Em procariotos, a conversão de xilose em xilulose realiza-se por meio da enzima xilose isomerase (XI). Para uma conversão completa de D-xilose, somente o gene *XI* teria que ser expresso adicionalmente quando uma xiluloquinase endógena está presente. Embora uma xilose isomerase possa ser detectada em alguns fungos (Tomoyeda and Horitsu, 1964; Vongsuvanglert and Tani, 1988; Banerjee *et al.*, 1994; Rawat *et al.*, 1996), somente a degradação de xilose através das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase foi mostrada em eucariotos. Muitos esforços para expressar heterologicamente uma xilose isomerase de organismos diferentes falharam (Gárdonyi and Hahn-Hägerdal, 1993). Na maioria dos casos, as enzimas não foram funcionais em levedura ou não foram sintetizadas em proteínas (Sarthy *et al.*, 1987; Amore *et al.*, 1989; Moes *et al.*, 1996). Com alta atividade, somente a xilose isomerase pode ser expressa na levedura do fungo anaeróbico obrigatório *Piromyces* sp. E2 (Kyper *et al.*, 2003). Superexpressando heterologicamente esta xilose isomerase eucariótica (Harhangi *et al.*, 2003), *S. cerevisiae* foi capaz de crescer em xilose e também metabolizar sob condições anaeróbicas (Kuyper *et al.*, 2003). Entretanto, testes adicionais mostraram que a enzima é fortemente inibida pelo xilitol, um produto da conversão de xilose. Xilitol é formado inespecificamente em levedura a partir da xilose por meio de aldose redutases.

US 6.475.768 descreve o uso de uma xilose isomerase termofílica procariótica de *Thermus thermophilus* e variantes da mesma, respectivamente, para a metabolização de xilose por leveduras. A temperatura ótima desta enzima ou das variantes está em uma temperatura ($> 70^{\circ}\text{C}$), que é acentuadamente superior do que a temperatura na qual a levedura cresce e metaboliza (28 a 35°C); entretanto, a levedura é inativa ou morre em temperaturas acima de 40°C . Entretanto, em temperaturas de aproximadamente 30°C , a xilose isomerase de *Thermus thermophilus* e também as variantes são virtualmente inativas. Dessa forma, esta enzima e suas variantes não permitem à levedura metabolizar efetivamente a xilose.

Por isso, uma necessidade existe na técnica anterior de pentose isomerases, particularmente xilose isomerases permitindo uma conversão de pentose melhorada e mais eficiente, particularmente conversão de xilose.

É dessa forma um objetivo da presente invenção fornecer pentose isomerases melhoradas, particularmente xilose isomerases, para o uso na conversão de xilose, que em particular pode ser usada para cepas de levedura industriais.

Construtos de Xilose isomerase (XI) e seu uso

O objetivo é alcançado de acordo com a invenção fornecendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos, que codifica para uma xilose isomerase procariótica (XI), para

- a transformação de uma célula, preferencialmente para a expressão recombinante e produção da xilose isomerase,
- a conversão de xilose em xilulose pela célula, e/ou
- a formação de produtos secundários a partir de xilose pela célula.

Em particular para os seguintes usos:

- a transformação de uma célula, preferencialmente para a expressão/produção recombinante da xilose isomerase procariótica,
- a conversão/metabolização, particularmente fermentação, de biomaterial contendo xilose,
- a produção de produtos químicos com base biológica,
- a produção de biobutanol,
- a produção de bioetanol.

Deve ser entendido que "produtos secundários" significam aqueles compostos, que a célula produz além de xilose convertida em xilulose, tal como, por exemplo, produtos químicos com base biológica e bioalcoóis.

Deve ser entendido que "produtos químicos com base biológica" significam compostos e substâncias químicas, que são obtidas de materiais biológicos e matérias-primas (biomassa), particularmente usando microorganismos.

Os produtos químicos com base biológica podem ser compostos, que são selecionados a partir de, mas não limitados a: ácido láctico, áci-

do acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, outros alcoóis, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerina, um antibiótico β -lactâmico ou uma cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides ou a molécula precursora amorfadieno do fármaco antimalárico artemisinina.

5 Os termos "conversão" e "metabolização" são usados sinonimamente e significam o metabolismo de uma substância ou a conversão de uma substância no curso do metabolismo, aqui: a conversão de xilose, particularmente a conversão de xilose em xilulose, por uma célula, que foi transformada com um ácido nucleico de acordo com a invenção. Uma conver-
10 são/metabolização preferencial é fermentação.

As moléculas de ácidos nucleicos são moléculas de ácidos nucleicos recombinantes. Além disso, as moléculas de ácidos nucleicos de acordo com a invenção compreendem dsDNA, ssDNA, PNA, CNA, RNA ou mRNA ou combinações dos mesmos.

15 A xilose isomerase procariótica (XI) de acordo com a invenção provém de *Clostridium phytofermentans*.

Nesta invenção, foi alcançado com um sistema teste para expressar uma xilose isomerase procariótica altamente funcional de *Clostridium phytofermentans* na levedura *S. cerevisiae*. Pode ser mostrado que a
20 xilose isomerase encontrada permite a leveduras recombinantes metabolizar eficientemente a xilose.

A xilose isomerase procariótica (XI) de acordo com a invenção pode ser expressa em células, particularmente células eucarióticas, em uma forma ativa. Adicionalmente, a xilose isomerase procariótica (XI) de acordo
25 com a invenção é menos sensível a uma inibição pelo xilitol do que a xilose isomerase eucariótica de um fungo anaeróbico conhecido a partir da técnica anterior.

Quando a codificação de sequência de ácidos nucleicos da xilose isomerase procariótica (XI) é expressa em uma célula, é transmitida à
30 célula a capacidade de converter xilose em xilulose, que então pode ser ainda metabolizada. Por isto, a célula é capaz de crescer em xilose como uma fonte de carbono.

A xilose isomerase procariótica (XI) de acordo com a invenção preferencialmente compreende uma sequência de aminoácidos, que é pelo menos 70% idêntica, preferencialmente pelo menos 80% idêntica, mais preferencialmente pelo menos 90% idêntica, até mais preferencialmente pelo menos 95% idêntica e ainda mais preferencialmente 99% idêntica ou idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.

A sequência de ácidos nucleicos que codifica uma xilose isomerase procariótica (XI) preferencialmente compreende uma sequência de ácidos nucleicos, que é pelo menos 70% idêntica, preferencialmente pelo menos 80% idêntica, mais preferencialmente pelo menos 90% idêntica, até mais preferencialmente pelo menos 95% idêntica e ainda mais preferencialmente 99% idêntica ou idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2.

As moléculas de ácidos nucleicos de acordo com a invenção preferencialmente compreendem sequências de ácidos nucleicos, que são idênticas à sequência de ácidos nucleicos naturais ou são códon-otimizadas para o uso em uma célula hospedeira.

Cada aminoácido é encriptado em um nível gênico por um códon. Entretanto, há vários códons diferentes, que codificam para um aminoácido único. Dessa forma, o código genético é degenerado. A escolha preferencial de um códon para um aminoácido correspondente diferencia-se de organismo para organismo. Por isso, problemas podem surgir em genes heterologamente expressos se o organismo hospedeiro ou a célula hospedeira tiverem um uso de códon muito diferente. O gene não pode ser expresso de modo nenhum ou somente lentamente. Mesmo em genes de vias metabólicas diferentes dentro de um organismo, um uso de códon diferente pode ser descoberto. É conhecido que os genes de glicólise de *S. cerevisiae* são expressos fortemente. Têm um uso de códon muito restritivo. Pode ser suposto que adaptando o uso de códon do gene de xilose isomerase bacteriana ao uso de códon dos genes de glicólise de *S. cerevisiae*, uma melhora da conversão de xilose na levedura é alcançada.

Em uma modalidade preferencial, a sequência de ácidos nucleí-

cos que codifica para uma xilose isomerase procariótica (XI) compreende uma sequência de ácidos nucleicos, que é códon-otimizada para o uso em uma célula hospedeira.

5 A códon-otimização substancialmente preferencialmente consiste em uma adaptação do uso de códon ao uso de códon do organismo hospedeiro/célula hospedeira, tal como levedura. O uso de códon do gene de xilose isomerase bacteriana é preferencialmente adaptado ao uso de códon do gene de glicólise de *S. cerevisiae*. Para detalhes adicionais, ver também o exemplo 2 e a tabela 1.

10 A sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma xilose isomerase procariótica (XI) preferencialmente compreende uma sequência de ácidos nucleicos, que é pelo menos 70% idêntica, preferencialmente pelo menos 80% idêntica, mais preferencialmente pelo menos 90% idêntica, até mais preferencialmente pelo menos 95% idêntica e ainda mais preferencialmente 99% idêntica ou idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:
15 3.

A molécula de ácido nucleico usada de acordo com a invenção é preferencialmente um construto de expressão de ácido nucleico.

20 Os construtos de expressão de ácidos nucleicos de acordo com a invenção são cassetes de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção, ou vetores de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção ou um cassete de expressão, por exemplo.

25 Um construto de expressão de ácido nucleico preferencialmente compreende sequências promotoras e terminadoras, o promotor sendo operacionalmente ligado à sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma xilose isomerase procariótica (XI).

Sequências promotoras preferenciais são selecionadas a partir de HXT7, HXT7 truncado, PFK1, FBA1, PGK1, ADH1 e TDH3.

30 Sequências terminadoras preferenciais são selecionadas a partir de CYC1, FBA1, PGK1, PFK1, ADH1 e TDH3.

O construto de expressão de ácido nucleico pode compreender

ainda sequências de reconhecimento 5' e/ou 3' e/ou marcadores de seleção.

O marcador de seleção é preferencialmente selecionado a partir de um gene marcador LEU2, um gene marcador URA3 e um gene marcador de resistência a antibiótico dominante. Um gene marcador de resistência a antibiótico dominante preferencial é selecionado a partir de genes, que transmitem resistências à geneticina, higromicina e nourseotricina.

Um vetor de expressão pode ser selecionado a partir do grupo de pRS303X, p3RS305X, p3RS306X, pRS41H, pRS41K, pRS41N, pRS42H, pRS42K, pRS42N ou p423HXT7-6HIS, p424HXT7-6HIS, p425HXT7-6HIS, p426HXT7-6HIS.

A célula a ser transformada é preferencialmente um micro-organismo eucariótico, preferencialmente uma célula de levedura ou uma célula de fungo filamentososo.

A célula de levedura é preferencialmente membro de um gênero selecionado a partir do grupo de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, *Arxula* e *Yarrowia*.

A célula de levedura é mais preferencialmente um membro de uma espécie selecionada a partir do grupo de *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* e *K. fragilis*.

A célula de fungo filamentososo é preferencialmente membro de um gênero selecionado a partir do grupo de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* e *Penicillium*.

25 Células fermentadoras de xilose

O objeto é alcançado de acordo com a invenção pelo fornecimento de células, que são transformadas com um construto de expressão de ácido nucleico que codifica uma xilose isomerase procariótica (XI).

Uma célula de acordo com a invenção é preferencialmente uma célula eucariótica.

Uma célula de acordo com a invenção, particularmente célula eucariótica, é transformada com um construto de expressão de ácido nucleico

co compreendendo:

(a) uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma xilose isomerase procariótica (XI),

5 (b) um promotor operacionalmente ligado à sequência de ácidos nucleicos, permitindo a expressão da xilose isomerase procariótica (XI) na célula.

Neste contexto, a expressão do construto de expressão de ácido nucleico transmite à célula a capacidade de isomerizar diretamente a xilose em xilulose.

10 Como discutido acima, a xilose isomerase procariótica (XI) de acordo com a invenção pode ser expressa em células, particularmente células eucarióticas, em uma forma ativa tal que as células possam isomerizar dessa forma diretamente xilose em xilulose (ver também figura 2).

15 Adicionalmente, as xilose isomerases procarióticas (XI) de acordo com a invenção são menos sensíveis a uma inibição pelo xilitol do que as xilose isomerases eucarióticas de um fungo anaeróbico conhecido da técnica anterior.

20 Os inventores introduziram uma via metabólica redox-neutra em *S. cerevisiae* na qual a conversão de xilose em xilulose se realiza por meio de uma xilose isomerase (XI) (figura 2).

25 Quando a sequência de ácidos nucleicos que codifica para xilose isomerase procariótica (XI) é expressa em uma célula, é transmitida à célula a capacidade de converter xilose em xilulose, que então pode ser posteriormente metabolizada. Por isto, a célula é capaz de crescer em xilose como uma fonte de carbono.

30 A xilose isomerase procariótica (XI) de acordo com a invenção preferencialmente provém de *Clostridium phytofermentans*. A xilose isomerase (XI) de acordo com a invenção preferencialmente compreende uma sequência de aminoácidos, que é pelo menos 70% idêntica, preferencialmente pelo menos 80% idêntica, mais preferencialmente pelo menos 90% idêntica, até mais preferencialmente pelo menos 95% idêntica e ainda mais preferencialmente 99% idêntica ou idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID

NO: 1.

O promotor (b) é preferencialmente selecionado a partir de HXT7, HXT7 truncado, PFK1, FBA1, PGK1, ADH1 e TDH3.

5 Em uma modalidade preferencial, o construto de expressão de ácido nucleico com o qual uma célula de acordo com a invenção é transformada é uma molécula de ácido nucleico de acordo com a invenção, como definido neste pedido e acima.

10 A célula de acordo com a invenção é preferencialmente um micro-organismo eucariótico, preferencialmente uma célula de levedura ou uma célula de fungo filamentoso.

Uma célula de levedura de acordo com a invenção é preferencialmente membro de um gênero selecionado a partir do grupo de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, *Arxula* e *Yarrowia*.

15 Uma célula de levedura de acordo com a invenção é mais preferencialmente um membro de uma espécie selecionada a partir do grupo de *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* e *K. fragilis*.

20 Uma célula de levedura de acordo com a invenção é mais preferencialmente a cepa Ethanol Red™ ou Lallemand1.

Uma célula de fungo filamentoso de acordo com a invenção é preferencialmente um membro de um gênero selecionado a partir do grupo de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* e *Penicillium*.

25 A célula de acordo com a invenção é preferencialmente uma célula mantida em uma cultura celular ou uma célula cultivada.

As células de acordo com a invenção são transientemente ou estavelmente transformadas com o construto de expressão de ácido nucleico ou a molécula de ácido nucleico, como definido neste pedido.

30 Em uma modalidade, uma célula de acordo com a invenção expressa ainda uma ou mais enzimas, que transmitem à célula a capacidade de produzir um ou mais produtos adicionais de metabolização.

Neste contexto, tal produto adicional de metabolização é prefe-

encialmente selecionado a partir de, mas não limitado ao grupo de produtos químicos com base biológica, tais como ácido lático, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, outros alcoóis, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, um antibiótico β -lactâmico ou
5 uma cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides ou a molécula precursora amorfadieno do fármaco antimalárico artemisinina.

O objeto é alcançado de acordo com a invenção pelo uso das células de acordo com a invenção para a conversão/metabolização, particularmente fermentação, do biomaterial contendo xilose e/ou para a produção
10 de bioetanol.

O objeto é alcançado de acordo com a invenção pelo uso das células correspondentes de acordo com a invenção para a conversão/metabolização, particularmente fermentação, de biomaterial contendo xilose e/ou para a produção de um produto de metabolização.

Neste contexto, o produto de metabolização é preferencialmente selecionado a partir do grupo de produtos químicos com base biológica (mas não limitado a este grupo de produtos químicos com base biológica), tais como ácido lático, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, outros alcoóis, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno,
15 glicerol, um antibiótico β -lactâmico ou uma cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides ou a molécula precursora amorfadieno do fármaco antimalárico artemisinina.

O objeto é alcançado de acordo com a invenção fornecendo um método para a produção do bioetanol.

O método de acordo com a invenção compreende as seguintes etapas:

(a) conversão de um meio contendo uma fonte de xilose com uma célula de acordo com a invenção, que converte a xilose em etanol,

(b) opcionalmente obtenção do bioetanol.

O bioetanol é obtido por isolamento, por exemplo.

O meio também pode conter outra fonte de carbono adicional, particularmente glicose.

A produção do bioetanol preferencialmente realiza-se em uma taxa de pelo menos 0,03 g de etanol por g de peso seco de levedura e hora.

O rendimento de etanol é preferencialmente pelo menos 0,3 g de etanol por g de xilose.

5 O objeto é alcançado de acordo com a invenção fornecendo um método para a produção de um produto de metabolização.

Neste contexto, esse produto adicional de metabolização é preferencialmente selecionado a partir de, mas não limitado ao grupo de produtos químicos com base biológica, tais como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, outros alcoóis, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, um antibiótico β -lactâmico ou
10 uma cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides ou a molécula precursora amorfadieno do fármaco antimalárico artemisinina.

O método de acordo com a invenção compreende as seguintes
15 etapas:

(a) conversão/metabolização, particularmente fermentação, de um meio contendo uma fonte de xilose com uma célula correspondente de acordo com a invenção, que converte xilose para produzir o produto de metabolização,

20 (b) opcionalmente obtenção do produto de metabolização.

O produto de metabolização é obtido por isolamento, por exemplo.

O meio também pode conter outra fonte de carbono adicional, particularmente glicose.

25 Os inventores tiveram sucesso em introduzir uma via metabólica redox-neutra em *S. cerevisiae* na qual a conversão de xilose em xilulose se realiza por meio de uma xilose isomerase (XI) (figura 2).

Nesta invenção, foi alcançado com um sistema teste para expressar uma xilose isomerase procariótica altamente funcional de *Clostridium phytofermentans* na levedura *S. cerevisiae*. Pode ser mostrado que a
30 xilose isomerase encontrada permite a leveduras recombinantes metabolizar eficientemente xilose.

Além disso, uma pluralidade de obstáculos e dificuldades experimentais teve que ser superada no achado de uma xilose isomerase funcional:

- 5 - 5 genes tiveram que ser superexpressos para a construção da cepa teste MKY09.
- A escolha das xilose isomerases a serem testadas não foi trivial.
- Todas as xilose isomerases bacterianas até aqui testadas não mostraram atividade muito baixa na levedura.
- 10 - Alta despesa no cultivo dos organismos a serem testados, que foram necessários para o rastreamento.
- A xilose isomerase de acordo com a invenção é a primeira xilose isomerase procariótica altamente ativa descrita em levedura.
- A xilose isomerase de acordo com a invenção é a primeira xilose isomerase do grupo II (de três grupos) das xilose isomerases (ver figura 3), que pode
15 ser expressa funcionalmente em leveduras.
- A xilose isomerase de acordo com a invenção somente é levemente inibida por xilitol.

Vários relatos sobre as dificuldades quanto à expressão funcional de xilose isomerases na levedura existem (Gárdonyi and Hahn-Hägerdahl, 2003; bem como referência citada neste).

Os inventores tiveram sucesso pela primeira vez em expressar uma xilose isomerase procariótica em forma funcional em leveduras tal que sejam capazes de metabolizar xilose sob condições fisiológicas e em quantidades significantes e convertê-la em produtos (por exemplo, etanol). Como
25 descrito na técnica anterior, isto não é trivial. Numerosas tentativas foram feitas e todas foram por enquanto malsucedidas (ver Sarthy *et al.*, 1987; Amore *et al.*, 1989; Moes *et al.*, 1996, US 6.475.768). Os inventores tiveram sucesso agora em demonstrar que especialmente a xilose isomerase de *C. phytofermentans*, em contraste com todas as outras enzimas procarióticas
30 até aqui conhecidas, permitem à levedura metabolizar xilose sob condições fisiológicas e em quantidades significantes e gerar produtos fora dela.

Exemplos de hidrolisados lignocelulósicos tendo uma proporção

significante de xilana (Hayn *et al.*, 1993):

Gramma: 16%

Farelo de trigo: 19%

Resíduos de milho: 19%

5 A presente invenção é esclarecida ainda nas seguintes figuras, sequências e exemplos, entretanto, sem ser limitada a estes. As referências citadas são totalmente incorporadas por referência neste pedido. As sequências e figuras mostram:

10 SEQ ID NO: 1 a sequência proteica da ORF (região de leitura aberta) de xilose isomerase de *C. phytofermentans*, (ver também Nos. de Acesso no GenBank ABX41597 e CP000885 (de 19 de novembro de 2007)),

SEQ ID NO: 2 a sequência de ácidos nucleicos da região de leitura aberta (ORF) da xilose isomerase de *C. phytofermentans*, (ver também No. de Acesso no GenBank CP000885 (de 19 de novembro de 2007)),

15 SEQ ID NO: 3 a sequência de ácidos nucleicos da região de leitura aberta (ORF) da xilose isomerase de *C. phytofermentans* em uma forma códon-otimizada.

Figura 1. Composição de biomassa

20 Biomassa consiste em celulose, hemicelulose e lignina. A segunda hemicelulose de maior ocorrência é um polímero altamente ramificado consistindo em pentoses, ácidos urônicos e hexoses. Em uma larga proporção, a hemicelulose consiste nas pentoses xilose e arabinose.

Figura 2. Diagrama da conversão de D-xilose em *S. cerevisiae* recombinante por meio de isomerização direta

25 **Figura 3. Árvore genealógica das diferentes xilose isomerases**

A árvore genealógica das xilose isomerases testadas é representada. Comparações quanto à similaridade das xilose isomerases foram realizadas com o programa "MEGA versão 4".

Figura 4. Vetores usados

30 O plasmídeo inicial para a construção de p426H7-XI-Clos (B) ou p426H7-opt.XI-Clos (C) foi o plasmídeo p426HXT7-6HIS (A). O vetor p426HXT7-6HIS é um plasmídeo de expressão de 2 μ , que tem um marca-

dor *URA3*. A região de leitura aberta (ORF) e sua forma códon-otimizada de xilose isomerase de *C. phytofermentans* de acordo com a invenção, respectivamente, foram clonadas atrás do promotor *HXT7* forte truncado e o terminador *CYC1* do plasmídeo p426HXT7-6HIS.

5 **Figura 5.** *Comportamento de crescimento em meio contendo xilose usando os diferentes genes de xilose isomerase*

Testes de crescimento de cepas de *S. cerevisiae* recombinantes, que incluem o metabolismo de D-xilose bacteriana com a xilose isomerase de *C. phytofermentans*. Os testes de crescimento foram realizados em pla-
10 cas de ágar com meio SC e xilose 2% como a única fonte de carbono. A forma natural (B) e a códon-otimizada (C) da xilose isomerase de *C. phytofermentans* foram testadas. O vetor vazio p426HXT7-6HIS (A) serviu como o controle negativo.

15 **Figura 6.** *Conversão de xilose em cepas de levedura recombinantes usando uma xilose isomerase bacteriana*

A conversão de xilose de células de levedura recombinantes MKY09, que continham a forma natural e a códon-otimizada da xilose isomerase de *C. phytofermentans* foi testada. O vetor vazio p426HXT7-6HIS serviu como uma comparação. As curvas de crescimento foram realizadas em meio
20 SC líquido com xilose 1,4% sob condições aeróbicas. Amostras de HPLC foram tomadas em paralelo para medir a densidade ótica em 600 nm. Ver também tabela 2, exemplo 3.

Figura 7. *Cinética enzimática*

25 *Gráfico de Eadie-Hofstee da conversão de xilose da xilose isomerase natural e da códon-otimizada de C. phytofermentans*

A cepa CEN.PK2-1C transformada com o plasmídeo p426H7-XI-Clos e p426H7-opt.XI-Clos, respectivamente, foi cultivada por uma noite em meio completo sintético com glicose 2% e nenhuma uracila. Os extratos brutos foram preparados e os testes quantitativos de enzima foram realizados.
30 Um resultado representativo é mostrado. Os valores indicados na tabela 3 são valores médios de pelo menos 3 medidas independentes.

Exemplos

Métodos

1. Cepas e meios

- Bactérias

- *E. coli* SURE (Stratagene)
- 5 - *E. coli* DH5 α (Stratagene)
- *Bacillus licheniformis* (37°C)
- *Agrobacterium tumefaciens* (26°C)
- *Burkholderia xenovorans* (28°C)
- *Clostridium phytofermentans* (30°C, anaeróbica)
- 10 - *Lactobacillus pentosus* (30°C)
- *Leifsonia xyli* (28°C)
- *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (28°C)
- *Robiginitalea biformata* (30°C)
- *Saccharophagus degradans* (26°C)
- 15 - *Salmonella typhimurium* LT2 (28°C)
- *Staphylococcus xylosus* (37°C)
- *Streptomyces diastaticus* (28°C)
- *Xanthomonas campestris* (26°C)

Outros organismos

- 20 - *Arabidopsis thaliana* (DNA genômico)

Meios e cultivo de *E. coli*

Meio LB completo:

triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, pH 7,5 (ver Maniatis, 1982).

- 25 Para seleção de resistência a antibiótico codificada por plasmídeo, 40 μ g/ml de ampicilina foram adicionados ao meio após autoclavagem. Meios de cultura sólidos adicionalmente continham ágar 2%. A cultura realizou-se a 37°C.

Meios e cultivo de bactérias adicionais

- 30 Composição dos meios e condições de cultura, ver informação do DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Brunswick, Alemanha).

- Levedura

Cepa CEN.PK2-1C

CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1MAL2-8c SUC2*)

Cepa MYK09

- 5 MKY09 é baseada na cepa CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1MAL2-8C SUC2, PromTKL1::loxP-Prom-vkHXT7, PromRPE1::loxP-Prom-vkHXT7, PromRKI1::loxP-Prom-vkHXT7, PromGAL2::loxP-Prom-vkHXT7, PromXKS1::loxP-Prom-vkHXT7*), incluindo mutações adicionais desconhecidas.

Meios e cultivo de leveduras

- 10 Meio SC seletivo completo sintético:

Base nitrogenada de levedura sem aminoácidos 0,67%, pH 6,3, solução de aminoácido/nucleobase, fonte de carbono na concentração respectivamente dada

Meio SM seletivo mínimo sintético:

- 15 Base nitrogenada de levedura sem aminoácido 0,16% e sulfato de amônio, sulfato de amônio 0,5%, di-hidrogenofosfato de potássio 20 mM, pH 6,3, fonte de carbono na concentração respectivamente dada

- 20 Concentração dos aminoácidos e nucleobases no meio completo sintético (de acordo com Zimmermann, 1975): adenina (0,08 mM), arginina (0,22 mM), histidina (0,25 mM), isoleucina (0,44 mM), leucina (0,44 mM), lisina (0,35 mM), metionina (0,26 mM), fenilalanina (0,29 mM), triptofano (0,19 mM), treonina (0,48 mM), tirosina (0,34 mM), uracila (0,44 mM), valina (0,49 mM). L-arabinose e D-glicose foram usadas como a fonte de carbono.

2. Plasmídeos

- 25 Plasmídeos usados

Plasmídeo	Fonte/referência	Descrição
p426HXT7-6HIS (=p426H7)	Hamacher <i>et al.</i> , 2002	plasmídeo de expressão de 2 μ para a superexpressão de genes e para a produção de um epítipo His ₆ ; gene marcador de seleção <i>URA3</i> , promotor <i>HXT7</i> truncado e terminador <i>CYC1</i>

Os plasmídeos construídos no decorrer deste trabalho

Plasmídeo

Plasmídeo	Descrição
p426H7-XI-Agro	Clonagem da XI de <i>A. tumefaciens</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Arab	Clonagem da XI de <i>A. thaliana</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-BaLi	Clonagem da XI de <i>B. licheniformis</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Burk	Clonagem da XI de <i>B. xenovorans</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Clos	Clonagem da XI de <i>C. phytofermentans</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-opt.XI-Clos	Clonagem da XI códon-otimizada de <i>C. phytofermentans</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Lacto	Clonagem da XI de <i>L. pentosus</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Leif	Clonagem da XI de <i>L. xyli</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-opt.XI-Piro	Clonagem da XI códon-otimizada de <i>Piromyces</i> sp.E2 em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Pseudo	Clonagem da XI de <i>P. syringae</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Robi	Clonagem da XI de <i>R. biformata</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Saccha	Clonagem da XI de <i>S. degradans</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Salmo	Clonagem da XI de <i>S. typhimurium</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Staph	Clonagem da XI de <i>S. xylosus</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Strep	Clonagem da XI de <i>S. diastaticus</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆
p426H7-XI-Xantho	Clonagem da XI de <i>X. campestris</i> em p426HXT7-6HIS omitindo o epitopo His ₆

3. Transformação:

5 - Transformação de *E. coli*

A transformação de células de *E. coli* foi realizada com o método de eletroporação de acordo com Dower *et al.* (1988) e Wirth (1993) por meio de um instrumento Easyject prima (EQUIBO).

- Transformação de *S. cerevisiae*

5 A transformação de cepas de *S. cerevisiae* com DNA plasmidial ou fragmentos de DNA foi realizada conforme o método por acetato de lítio de acordo com Gietz and Woods (1994).

4. Preparação de DNA

- Isolamento de DNA plasmidial de *E. coli*

10 O isolamento de DNA plasmidial de *E. coli* foi realizado conforme o método de lise alcalina de acordo com Birnboim e Doly (1979), modificado de acordo com Maniatis *et al.* (1982) ou alternativamente com "QIAprep Spin Miniprep Kit" da companhia Qiagen.

15 DNA plasmidial de alta pureza para sequenciamento foi preparado com "Plasmid Mini Kit" da companhia Qiagen de acordo com instruções do fabricante.

- Isolamento de DNA plasmidial de *S. cerevisiae*

20 As células de uma cultura de levedura estacionária (5 ml) foram coletadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em 400 µl de tampão B1 (Plasmid Mini Kit, companhia Qiagen). Após adição de 400 µl de tampão B2 e 2/3 de um volume de contas de vidro (Ø 0,45 mm), o rompimento celular foi realizado por agitação por 5 minutos em um Vibrax (Vibrax-VXR de Janke & Kunkel ou IKA). 1/2 de um volume de tampão B3 foi adicionado ao sobrenadante, foi misturado e incubado por 10 min em gelo. Após 25 centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm, DNA plasmidial foi precipitado à temperatura ambiente pela adição de 0,75 ml de isopropanol ao sobrenadante. DNA precipitado pela centrifugação por 30 min a 13.000 rpm foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em 20 µl de água. 1 µl do DNA foi usado para a transformação em *E. coli*.

30 - PCR de Colônia de *B. licheniformis* e *S. degradans*

Quantidades menores de células foram coletadas de culturas bacterianas crescendo em uma placa por meio de um palito de dentes e

transferidas em um recipiente de reação de PCR. Após adição de H₂O, mistura de dNTP 0,2 mM, tampão de PCR 1X (contém MgCl₂ 1,5 mM) e em cada caso 10 pmol do iniciador oligonucleotídico correspondente, o rompimento celular foi realizado em um termociclador da companhia Techne a 99°C por 10 min. Este lote foi diretamente usado em uma reação de PCR como um molde. Pela adição de 1 U de polimerase, a reação de polimerase em cadeia foi iniciada com um volume total de 50 µl.

- Determinação da concentração de DNA

A concentração de DNA foi medida espectrofotometricamente em uma faixa de comprimento de onda de 240 a 300 nm. Se a pureza de DNA, determinada com o quociente $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$, for 1,8, a extinção $E_{260\text{nm}} = 1,0$ corresponde a uma concentração de DNA de 50 µg de dsDNA/ml (Maniatis *et al.*, 1982).

- Amplificação de DNA por meio de PCR

15 Uso de Phusion™ High Fidelity PCR Systems

A reação de polimerase em cadeia foi realizada em um volume total de 50 µl com o "Phusion™ High Fidelity PCR System" da companhia Finnzymes de acordo com as instruções do fabricante. Cada lote consistiu em 1 a 10 ng de DNA ou 1 a 2 colônias de levedura como o molde de síntese, mistura de dNTP 0,2 mM, tampão 2 1X (contém MgCl₂ 1,5 mM), 1 U de polimerase e em cada caso 100 pmol do iniciador oligonucleotídico correspondente. A reação de PCR foi realizada em um termociclador da companhia Techne e as condições de PCR foram escolhidas como se segue, como requerido:

1.	1x	30 s, 98°C	Desnaturação do DNA
2.	30x	10 s, 98°C	Desnaturação do DNA
		30 s, 52 a 62°C	Anelamento/ligação dos oligonucleotídeos ao DNA
		50 s, 72°C	síntese/alongamento do DNA
3.	1x	7 min, 72°C	síntese/alongamento do DNA

A polimerase foi adicionada após a primeira etapa de desnaturação ("PCR de partida a quente"). O número de etapas de síntese, a tempera-

tura de anelamento e o tempo de alongamento foram adaptados às temperaturas de fusão específicas dos oligonucleotídeos usados ou ao tamanho do produto esperado, respectivamente. Os produtos de PCR foram examinados por meio de uma eletroforese em gel de agarose e posteriormente purificados.

- Purificação de DNA de produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o "QIAquick PCR Purification Kit" da companhia Qiagen de acordo com as instruções do fabricante.

10 - Separação eletroforética em gel de fragmentos de DNA

A separação de fragmentos de DNA tendo um tamanho de 0,15 a 20 kb foi realizada em géis de agarose 0,5 a 1% com 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. Tampão TAE 1X (40 mM de Tris, 40 mM de ácido acético, 2 mM de EDTA) foi usado no gel e tampão de corrida (Maniatis *et al.*, 1982). DNA de fago lambda cortado com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *HindIII* serviu como um padrão de tamanho. Antes da aplicação, 1/10 de um volume do marcador azul (tampão TAE 1X, glicerina 10%, azul de bromofenol 0,004%) foi adicionado às amostras de DNA e foram visualizados após a separação pela irradiação com luz UV (254 nm).

20 - Isolamento de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose

O fragmento de DNA desejado foi cortado a partir do gel de agarose TAE sob luz UV de onda longa (366 nm) e isolado com "QIAquick Gel Extraction Kit" da companhia Qiagen de acordo com as instruções do fabricante.

25 5. Modificação enzimática de DNA

Restrição de DNA

Clivagem sequência-específica do DNA com endonucleases de restrição foi realizada por 1 hora com 2 a 5 U da enzima por µg de DNA sob as condições de incubação recomendadas pelo fabricante.

30 6. Análises de metabólito

Amostras foram tomadas em tempos diferentes e centrifugadas a 4°C por 15 min a 13.000 rpm e 450 µl foram coletados do sobrenadante. A

precipitação proteica foi realizada com ácido sulfossalicílico 50%. 1/10 de um volume de ácido sulfossalicílico foi adicionado às amostras, misturado e centrifugado por 20 min a 13.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e as amostras puderam ser usadas para a medida após outra diluição com água.

- 5 Amostras com D-glicose, D-xilose, xilitol, acetato, glicerina e etanol serviram como padrões, que foram empregados em concentrações de 0,05% p/p, 0,1% p/v, 0,5% p/v, 1,0% p/v e 2,0% p/v.

A concentração de açúcar e a concentração de etanol foram medidas por meio de BioLC (Dionex). O autoamostrador "AS50", o aquecedor de coluna "TCC-100", o detector RI "RI-101" (Shodex) e a bomba de gradiente "GS50" foram usados na medida. A medida das amostras foi realizada com a coluna VA 300/7.7 Nucleogel Sugar 810 H (Macherey-Nagel). A coluna foi eluída a uma temperatura de 65°C com H₂SO₄ 5 mM como o eluente e em uma taxa de fluxo de 0,6 ml.min⁻¹. A avaliação dos dados foi realizada com o programa Chromeleon Version 6.50TM (versão 6.50, Dionex).

7. Medida de atividades enzimáticas em *S. cerevisiae*

- Preparação de extratos brutos

50 ml de culturas de células de levedura foram cultivados à fase exponencial em meio mínimo sintético com glicose 2%. As células foram coletadas, lavadas duas vezes no tampão Tris-HCl (pH 7,5) e rompidas por meio de contas de vidro ($\varnothing = 0,45$ nm) por 8 min em um Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VBR) a 4°C. Fragmentos celulares foram removidos por centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e preenchido até 2 ml de tampão Tris-HCl gelado (pH 7,5) e usado como um extrato bruto para a determinação proteica e para a medida das atividades enzimáticas ou da inibição de xilitol.

- Determinação proteica

A concentração proteica foi determinada com o conjunto "Roti-Quant" da companhia Carl Roth GmbH+ Co. de acordo com as instruções do fabricante com base em Bradford (1976). Neste contexto, albumina sérica bovina (BSA) em concentrações de 0 a 100 µg/ml serviu como o padrão. Após um tempo de incubação de pelo menos 5 minutos à temperatura ambi-

ente, as amostras foram medidas em placas de microtítulo com um fotômetro de placa de microtítulo da companhia Molecular Devices em OD₅₉₀.

- Medida da atividade de xilose isomerase

Para determinar a atividade de xilose isomerase, células de levedura recombinantes contendo o vetor p426H7-XI-Clos ou p426H7-opt.XI-Clos, respectivamente, foram cultivadas, coletadas e extratos brutos foram preparados. Células de levedura recombinantes contendo o vetor vazio p426HXT7-6HIS serviram como uma comparação. Em um volume total de 1 ml, a conversão de 6,25 a 500 mM de xilose com 100 µl de extrato bruto, 0,23 mM de NADH, 10 mM de MgCl₂, 2 U de sorbitol desidrogenase em 100 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) foi continuamente monitorada. O reconhecimento de NADH como uma variável medida foi determinada espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 340 nm. A reação foi iniciada pela adição de xilose.

15 - Medida da inibição de xilitol

Para determinar a inibição de xilitol da xilose isomerase, células de levedura recombinantes contendo o vetor p426H7-XI-Clos foram cultivadas, coletadas e extratos brutos foram preparados. Células de levedura recombinantes com o vetor p426H7-opt.XI-Piro ou o vetor p426HXT7-6HIS, respectivamente, serviram como uma comparação. Em um volume total de 1 ml, a conversão de 6,25 a 500 mM de xilose com 100 µl de extrato bruto, 10 a 100 mM de xilitol, 0,23 mM de NADH, 10 mM de MgCl₂, 2 U de sorbitol desidrogenase em 100 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) foi continuamente monitorada. O reconhecimento de NADH como uma variável medida foi determinado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 340 nm. A reação foi iniciada pela adição de xilose.

Exemplo 1: Rastreamento de uma xilose isomerase procariótica altamente funcional

A) Construção de MKY09

30 Na cepa de levedura CEN.PK2-1C, todos os genes da via de pentose fosfato não oxidativa bem como a xiluloquinase (*XKS1*) e *GAL2* foram superexpressos. Para este fim, os promotores endógenos foram substi-

tuídos pelo promotor HXT7 truncado. Esta cepa foi denominada MKY09 e usada para o rastreamento de xilose isomerases funcionais.

B) Seleção das xilose isomerases a serem testadas

5 Para fazer uma seleção das xilose isomerases a serem testadas, as sequências proteicas das xilose isomerases do banco de dados NCBI BLAST foram comparadas. Um excerto da xilose isomerase obtido é representado na figura 3. 14 xilose isomerases de diferentes organismos foram selecionadas para serem testadas em sua funcionalidade na levedura.

C) Execução do rastreamento

10 Para este fim, DNA genômico foi isolado dos organismos. As células foram cultivadas, coletadas e rompidas (ver "Isolation of plasmid DNA from *S. cerevisiae*" e "Colony PCR from *B. licheniformis* and *S. degradans*", respectivamente). A região de leitura aberta (ORF) de *XI* dos organismos mencionados foi amplificada com iniciadores adicionalmente tendo regiões
15 homólogas ao promotor HXT7 ou terminador CYC1. Os produtos de PCR obtidos estavam em conjunto com o vetor p426HXT7-6HIS linearizado com *EcoRI/BamHI* transformado em levedura e clonados através de recombinação *in vivo* no plasmídeo entre o promotor HXT7 ou terminador CYC1, respectivamente (figura 4). A sequência dos plasmídeos obtidos foi verificada
20 por meio de análise de restrição. Além disso, a funcionalidade das novas isomerases e seu efeito sobre a conversão de xilose na levedura devem ser estudados. Entretanto, não foi possível amplificar o produto de PCR desejado com a xilose isomerase dos organismos *Streptomyces diastaticus* e *Leifsonia xyli*. Ambas xilose isomerases dessa forma não podem ser testadas
25 em funcionalidade em levedura.

D) Comportamento de crescimento (placa)

Das 12 diferentes xilose isomerases testadas, uma xilose isomerase foi encontrada, que foi funcional em cepa de levedura MKY09. Leveduras recombinantes contendo a xilose isomerase de *C. phytofermentans* mostraram bom crescimento em placas contendo xilose (figura 5).
30

Exemplo 2: Otimização de códon do gene para degradação de xilose em levedura

Otimização de códon de genes de acordo com o uso de códon dos genes de glicólise de *S. cerevisiae*

O uso de códon preferencial dos genes de glicólise de *S. cerevisiae* foi determinado e é listado na tabela 1. A ORF do gene *XI* de *C. phytofermentans* foi códon-otimizada. Isto é, as sequências da região de leitura aberta foram adaptadas ao uso de códon preferencial indicado abaixo. A sequência proteica das enzimas permaneceu inalterada. Os genes foram sintetizados por uma companhia externa e fornecidos na forma seca em vetores próprios da companhia. Detalhes adicionais sobre a síntese de genes podem ser encontrados sob www.geneart.com.

Tabela 1: Uso de códon preferencial dos genes glicolíticos de *S. cerevisiae*

Aminoácido	Uso de códon de genes códon-otimizados
Ala	GCT
Arg	AGA
Asn	AAC
Asp	GAC
Cys	TGT
Gln	CAA
Glu	GAA
Gly	GGT
His	CAC
Ile	ATT
Leu	TTG
Lys	AAG
Met	ATG
Phe	TTC
Pro	CCA
Ser	TCT
Thr	ACC
Trp	TGG
Tyr	TAC
Val	GTT

Aminoácido	Uso de códon de genes códon-otimizados
Parada	TAA

B) Introdução do gene de xilose isomerase códon-otimizada na cepa MKY09

Para testar o gene de xilose isomerase códon-otimizada na cepa MKY09, o gene teve que ser subclonado em um vetor de levedura. Para este fim, a *XI-ORF* códon-otimizada foi amplificada com iniciadores e clonada no vetor linearizado p426HXT7-6HIS (ver "Execução do rastreamento"). A sequência do plasmídeo obtido p426H7-opt.XI-Clos foi verificada por meio de análise de restrição. Para testar a funcionalidade da isomerase códon-otimizada, o plasmídeo p426H7-opt.XI-Clos foi transformado na cepa MKY09. Cepas de levedura recombinantes mostraram bom crescimento em placas com meio contendo xilose (figura 5). Caracterizações adicionais da *XI* nativa e da códon-otimizada de *C. phytofermentans* se seguem.

Exemplo 3: Caracterização da xilose isomerase procariótica funcional

A) Comportamento de crescimento e conversão de xilose

O crescimento da cepa MKY09 com a xilose isomerase nativa e a códon-otimizada de *C. phytofermentans* foi investigado em testes de crescimento em meio contendo xilose sob condições aeróbicas. O vetor vazio p426HXT7-6HIS serviu como uma comparação.

As cepas foram cultivadas em meio SC com glicose 0,1% e xilose 1,4% e inoculadas com uma $OD_{600nm} = 0,2$ em 50 ml de meio SC com glicose 0,1% e xilose 1,4%. A incubação foi realizada em frascos de agitação sob condições aeróbicas a 30°C. Amostras da determinação de densidade óptica e para a determinação da composição de metabólito foram tomadas várias vezes.

As curvas de crescimento mostraram que todas as leveduras recombinantes cresceram em glicose até uma OD_{600} de 2,5 (tabela 2). Após outras 50 h, a cepa de levedura contendo a xilose isomerase nativa de *C. phytofermentans* começou a crescer ainda em xilose e alcançou uma OD_{600} final de 3,5 em uma taxa de crescimento máxima de $0,0058 \text{ h}^{-1}$ em meio contendo xilose. A cepa de levedura com a xilose isomerase códon-

otimizada do mesmo modo alcançou uma OD_{600} final de 3,5. A taxa de crescimento máxima foi $0,0072 \text{ h}^{-1}$. Transformantes de levedura com o vetor vazio p426HXT7-6HIS não mostraram nenhum crescimento em xilose e começaram a morrer já após 150 h.

- 5 As leveduras recombinantes contendo a xilose nativa isomerase de *C. phytofermentans* ou a xilose isomerase códon-otimizada, respectivamente, converteram mais que 2,6 g da xilose em 312 horas (figura 6).

Tabela 2. Determinação da taxa de crescimento máximo em xilose (μ)	
MKY09 transformado com plasmídeo	Taxa máx. de crescimento
p426H7-XI-Clos	0,0058
p426H7-opt.XI-Clos	0,0072

- 10 Pode ser mostrado com este experimento que a introdução de xilose isomerase nativa bem como a códon-otimizada de *C. phytofermentans* permite o crescimento de cepas de *S. cerevisiae* recombinante em D-xilose e sua conversão. Por meio da otimização de códon da xilose isomerase, uma taxa de crescimento máxima superior pode ser alcançada.

B) Medida da atividade de xilose isomerase

- 15 Testes enzimáticos foram realizados diretamente após preparação de extrato bruto. A atividade de XI foi realizada a 30°C em uma mistura de reação (100 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM de MgCl_2 , 0,23 mM de NADH; 2 U de sorbitol desidrogenase) com concentrações de extrato bruto diferentes. A reação foi iniciada com 6,25 a 500 mM de xilose.

- 20 A determinação da cinética enzimática da forma nativa da xilose isomerase resultou em um valor de K_m de $61,85 \pm 3,41 \text{ mM}$ e para a forma códon-otimizada, um valor de K_m de $66,01 \pm 1 \text{ mM}$ (figura 7 e tabela 3). Como esperado, os valores de K_m foram dessa forma os mesmos uma vez que não se diferenciaram significativamente.

- 25 V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$) foi 0,0076 para a forma nativa da xilose isomerase e 0,0344 para a forma códon-otimizada (figura 7). Por isso, V_{\max} poderia ser aumentado em mais de 450% por meio de otimização de códon da enzima.

Tabela 3		
CEN.PK2-1C transformado com plasmídeo	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$)	K_m (mM)
p426H7-XI-Clos	0,0076	$61,85 \pm 3,4$
p426H7-opt.XI-Clos	0,0344	$66,01 \pm 1$

A cepa CEN.PK2-1C transformada com o plasmídeo p426H7-XI-Clos e p426H7-opt.XI-Clos, respectivamente, foi cultivada por uma noite em meio completo sintético com glicose 2% e sem uracila. Extratos brutos foram preparados e testes enzimáticos quantitativos foram realizados.

C) Medida da inibição de xilitol

A determinação da inibição de xilitol das xilose isomerases foi realizada diretamente após preparação de extrato bruto. A atividade de XI foi realizada a 30°C em uma mistura de reação (100 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM de MgCl_2 , 0,23 mM de NADH; 2 U de sorbitol desidrogenase) com concentrações de extrato bruto diferentes. Adicionalmente, concentrações diferentes do xilitol (10 a 100 mM) estavam presentes na mistura de reação. A reação foi iniciada com 6,25 a 500 mM de xilose.

K_i foi determinado através da equação $K_m' = K_m * (1 + i/K_i)$, i sendo a concentração de xilitol usada e K_m' sendo o valor de K_m aparente na concentração de xilitol correspondente.

A determinação da cinética da inibição de xilitol da forma de xilose isomerase de *C. phytofermentans* resultou em um valor de K_i de $14,24 \pm 1,48$ mM (tabela 4). Como já descrito várias vezes (Yamanaka *et al.*, 1969 e referências citadas neste), é uma inibição competitiva.

Tabela 4	
CEN.PK2-1C transformado com Plasplasmídeo	K_i (mM)
p426H7-opt.XI-Piro	$4,67 \pm 1,77$
p426H7-opt.XI-Clos	$14,51 \pm 1,08$

A cepa CEN.PK2-1C transformada com o plasmídeo p426H7-opt.XI-Clos e p426H7-opt.XI-Piro, respectivamente, foi cultivada por uma noite em meio completo sintético com glicose 2% e sem uracila. Extratos

brutos foram preparados e testes enzimáticos quantitativos com concentrações de xilitol constantes de 10 a 100 mM foram realizados.

A xilose isomerase de *Piromyces* sp. E2 e o vetor vazio p426HXT7-6HIS serviram como uma comparação. O valor de K_i determinado da xilose isomerase de *Piromyces* sp. E2 foi $4,67 \pm 1,77$ mM.

Pode ser visto dos valores de K_i determinados que a xilose isomerase de *C. phytofermentans* é significativamente menos inibida pelo xilitol do que a xilose isomerase de *Piromyces* sp. E2.

D) Exemplos de vetores para a xilose isomerase

O plasmídeo p426HXT7-6HIS foi o plasmídeo inicial para a construção de p426H7-opt.XI-Clos. O vetor é um plasmídeo de expressão de 2 μ , que tem um marcador *URA3*.

Os vetores de expressão ainda possíveis são da série de pRS303X, p3RS305X e p3RS306X. Estes são vetores integrativos, que têm um marcador antibiótico dominante. Detalhes adicionais sobre estes vetores podem ser encontrados em Taxis e Knop (2006).

Referências

- Amore, R., Wilhelm, M. and Hollenberg, C.P. (1989)**
The fermentation of xylose - an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**:351-357
- Banerjee, S., Archana, A. and Satyanarayana, T. (1994)**
Xylose metabolism in a thermophilic mould *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* TMD 8. *Curr. Microbiol.* **29**:349-352
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979)**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988)**
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.
Nucl. Acids Res. **16**: 6127-6145
- Eliasson, A., Christensson, C, Wahlbom, C.F. and Hahn-Hägerdal, B. (2000)**

- Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2* and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures.
Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3381-3386
- Gárdonyi, M. and Hahn-Hägerdahl, B. (2003)**
- 5 The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.
Enzym. Microb. Technol. **32**, 252-259
- Gietz, R.D. and Woods, R.A. (1994)**
High efficiency transformation in yeast.
- 10 In: Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, J. A. Johnston (Ed.).
Oxford University Press, pp. 121-134
- Hahn-Hägerdal, B., Wahlborn, CF., Gárdonyi, M., van Zyl, W., Otero, R.R.C. and Jönsson, L.J. (2001)**
Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization.
- 15 Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **73**:53-84
- Harhangi, H.R. (2003)**
Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. Strain E2 follows the bacterial pathway.
Arch Microbiol. **180**:134-141.
- 20 **Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmuller, H., Sinner, M. and Esterbauer, H. (1993)**
Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocelluloses.
In *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*, ed. Saddler, J.N.
25 (CAB international, Wallingford, UK), pp. 33-72.
- Ho, N.W.Y., Chen, Z. and Brainard, A.P. (1998)**
Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose.
Appl. Environ. Microbiol. **64**:1852-1859
- 30 **Kötter, P. and Ciriacy, M. (1993)**
Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:776-783

- Kyper, M. Harhangi, H.R., Stave, A.K., Winkler, A.A., Jetten, M.S., de Laat, W.T., den Ridder, J.J.J., Op den Camp, H.J., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (2003)**
High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?
5 *FEMS Yeast Res.* **4**:69-78
- Maniatis T, Fritsch, E.F and Sambrook, J. (1982)**
Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 10 **Metzger, M.H. and Hollenberg, C.P. (1994)**
Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* transformant.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**:319-325
- Moes, J.M., Pretorius, I.S. and van Zyl, W.H. (1996)**
15 Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*
Biotechnol. Lett. **18**: 269-274.
- Rawat, U., Phadthare, S., Deshpande, V. and Rao, M. (1996)**
A novel xylose isomerase from *Neurospora crassa*.
20 *Biotechnol. Lett.* **18**:1267-1270
- Sarthy A.V., McConaughy B.L., Lobo Z., Sundstrom J.A., Furlong C.E., Hall B.D.**
Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*.
25 *Appl Environ Microbiol.* 1987 Sep; 53(9): 1996-2000
- Schaaff-Gerstenschläger, I. and Miosga, T. (1997)**
The pentose phosphate pathway. In: Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications. Zimmermann, F.K. and Entian K.-D (Ed.), Chapter 15. Technomic, Lancaster, PA
- 30 **Taxis, C. and Knop, M. (2006)**
System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*.

BioTechniques **40**, No. 1

Tomoyeda, M. and Horitsu, H. (1964)

Pentose metabolism in *Candida utilis* Part I: Xylose isomerase.

Agric. Biol. Chem. 28:139-143.

5 **Vongsuvanglert, V. and Tani, Y. (1988)**

Purification and characterisation of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in sorbitol production from glucose.

Agric. Biol. Chem. **52**:1818-1824.

Yamanaka, K. (1969)

10 Inhibition of D-xylose isomerase by pentitols and D-lyxose.

Arch. Biochem. Biophys. 131, 502-506.

Zimmermann, F.K. (1975)

Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* **31**:71-81.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2, ou de SEQ ID NO: 3, a referida sequência de ácido nucleico codificando para uma xilose isomerase procariótica (XI), caracterizado pelo fato de ser para a transformação de uma célula de levedura, para expressão recombinante e produção da xilose isomerase ou para a conversão da xilose em xilulose pela célula de levedura, a xilose isomerase (XI) proveniente de *Clostridium phytofermentans* e compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para:
- a conversão ou metabolização de biomaterial contendo xilose,
 - produção de produtos químicos com base biológica, ou
 - produção de biobutanol e/ou bioetanol.
3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 codificando para uma xilose isomerase procariótica (XI) é códon-otimizada.
4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a molécula de ácido nucleico é um construto de expressão de ácido nucleico, que compreende sequências promotoras e terminadoras, o promotor sendo operacionalmente ligado com a sequência de ácido nucleico que codifica uma xilose isomerase (XI).
5. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o construto de expressão de ácido nucleico compreende ainda sequências de reconhecimento 5' e/ou 3' e/ou marcadores de seleção.
6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a célula de levedura é um membro de um gênero selecionado a partir do grupo de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, *Arxula* e *Yarrowia* e preferencialmente um membro de uma espécie selecionada a partir do grupo de *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* e *K. fragilis*.

7. Célula hospedeira isolada, caracterizada pelo fato de que é a célula de levedura *Saccharomyces cerevisiae* transformada com um construto de expressão de ácido nucleico compreendendo:

5 uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2, ou de SEQ ID NO: 3, e em que está operacionalmente ligada a um promotor permitindo a expressão de xilose isomerase (XI) de *Clostridium phytofermentans* na célula, em que a expressão do construto de expressão de ácido nucleico produz uma xilose isomerase funcional na célula hospedeira e transmite à célula hospedeira a capacidade de isomerizar diretamente uma xilose em xilulose.
10

8. Célula hospedeira isolada de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a célula é transformada com um vetor de expressão de ácido nucleico que é um construto de expressão de ácido nucleico que compreende sequências promotoras e terminadoras, o promotor sendo operacionalmente ligado com a sequência de ácido nucleico que codifica uma xilose isomerase (XI) de *Clostridium phytofermentans*, a referida sequência de ácido nucleico sendo SEQ ID NO: 2, ou SEQ ID NO: 3, e em que o construto de expressão de ácido nucleico opcionalmente ainda compreende sequências de reconhecimento 5' e/ou 3' e/ou marcadores de seleção.
15

9. Célula hospedeira isolada de acordo a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que expressa ainda uma ou mais enzimas, que transmitem à célula a capacidade de produzir produtos adicionais de metabolização,
20

os produtos adicionais de metabolização sendo preferencialmente selecionados a partir do grupo de produtos químicos com base biológica, tais como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, outros alcoóis, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, um antibiótico β -lactama ou uma cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides ou a molécula precursora amorfadieno do fármaco antimalárico artemisinina.
25
30

10. Uso de uma célula hospedeira isolada como definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizado pelo fato de ser para a conversão e metabolização, particularmente fermentação, de biomaterial contendo xilose e/ou produção de bioetanol.

5 11. Uso de uma célula hospedeira isolada como definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizado pelo fato de ser para a conversão e metabolização, particularmente fermentação, de biomaterial contendo xilose e/ou produção de um produto de metabolização,

o referido produto de metabolização sendo selecionado a partir de
10 ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, outros alcoóis, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, um antibiótico β -lactama ou uma cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides ou a molécula precursora amorfadieno do fármaco antimalárico artemisinina.

15 12. Método para a produção de bioetanol, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) contatar um meio contendo uma fonte de xilose com uma célula hospedeira isolada, como definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 9, de forma a converter xilose em etanol, e

20 (b) recuperar o bioetanol.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o meio contém uma fonte de carbono adicional, particularmente glicose.

25 14. Método de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que a produção do bioetanol se realiza em uma taxa de pelo menos 0,03 g de etanol por g de peso seco de levedura e hora.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizado pelo fato de que o rendimento de etanol é pelo menos 0,3 g de etanol por g de xilose.

30 16. Método para a produção de um produto de metabolização, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) contatar um meio contendo uma fonte de xilose com uma célula como definida na reivindicação 9, de forma a converter xilose no produto de metabolização,

(b) recuperar o produto de metabolização,

5 o produto de metabolização sendo selecionado a partir de ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, outros alcoóis, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, um antibiótico β -lactama ou uma cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides ou a molécula precursora amorfadieno do fármaco antimalárico artemisinina.

10 17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o meio contém uma fonte adicional de carbono, particularmente glicose.

FIG. 1

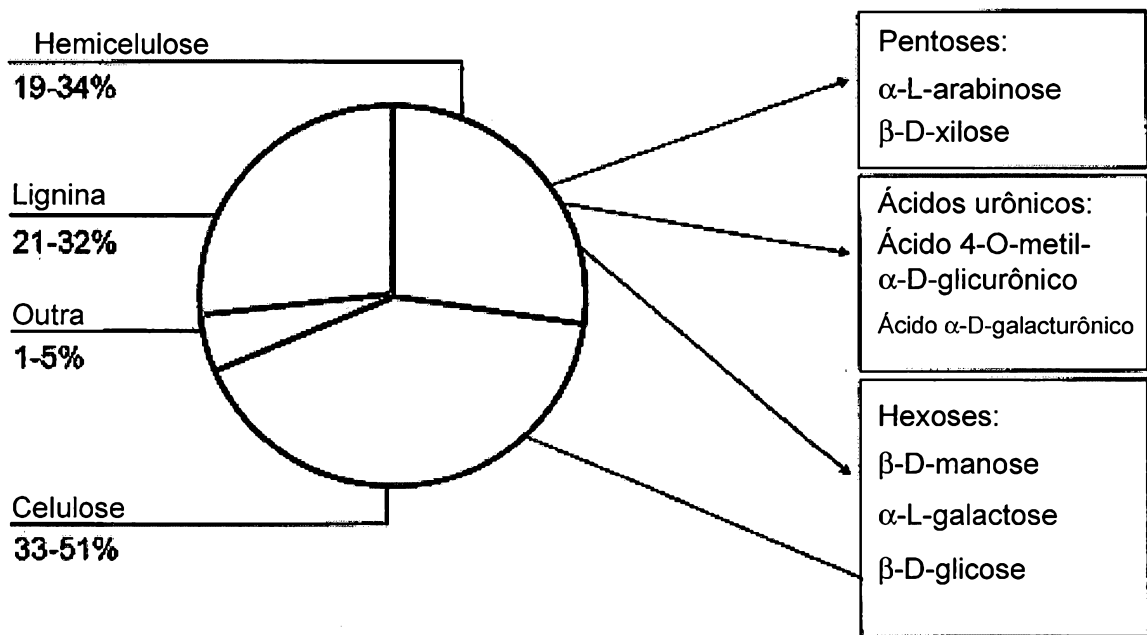


FIG. 2

Conversão de xilose por isomerização direta

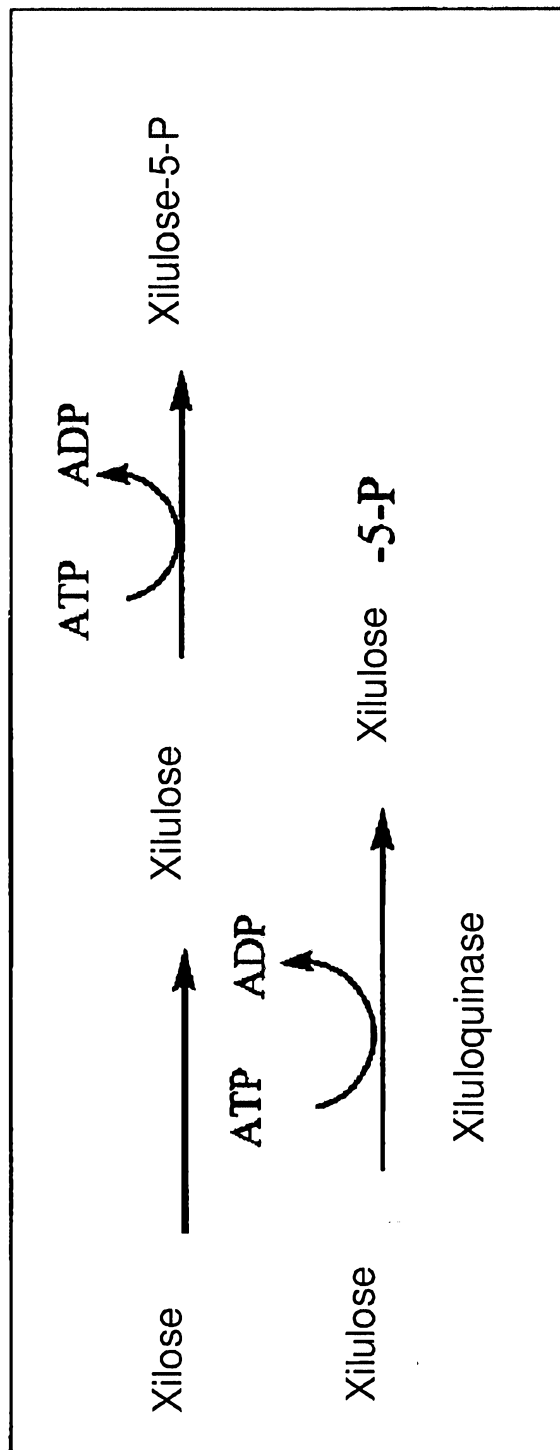


FIG. 4A

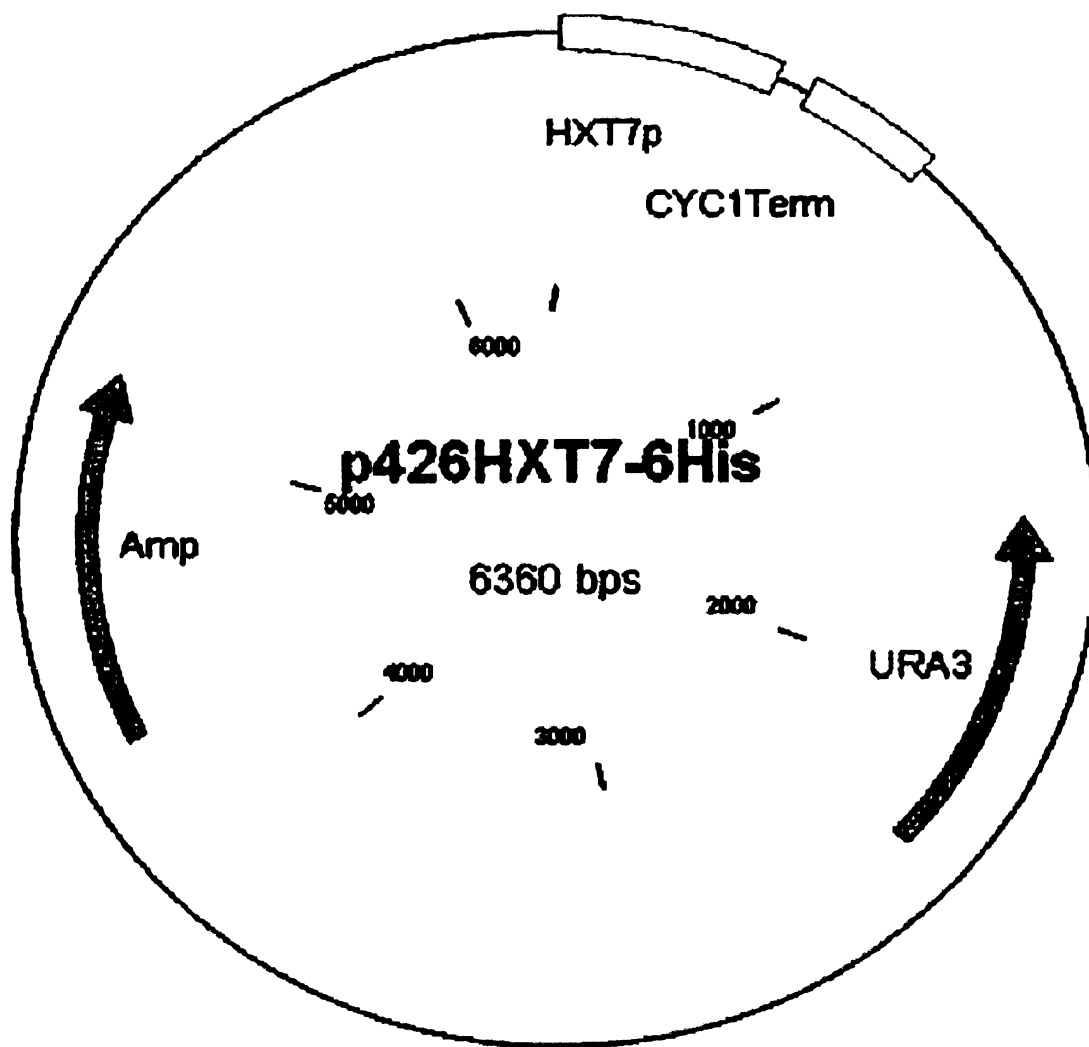


FIG. 4B

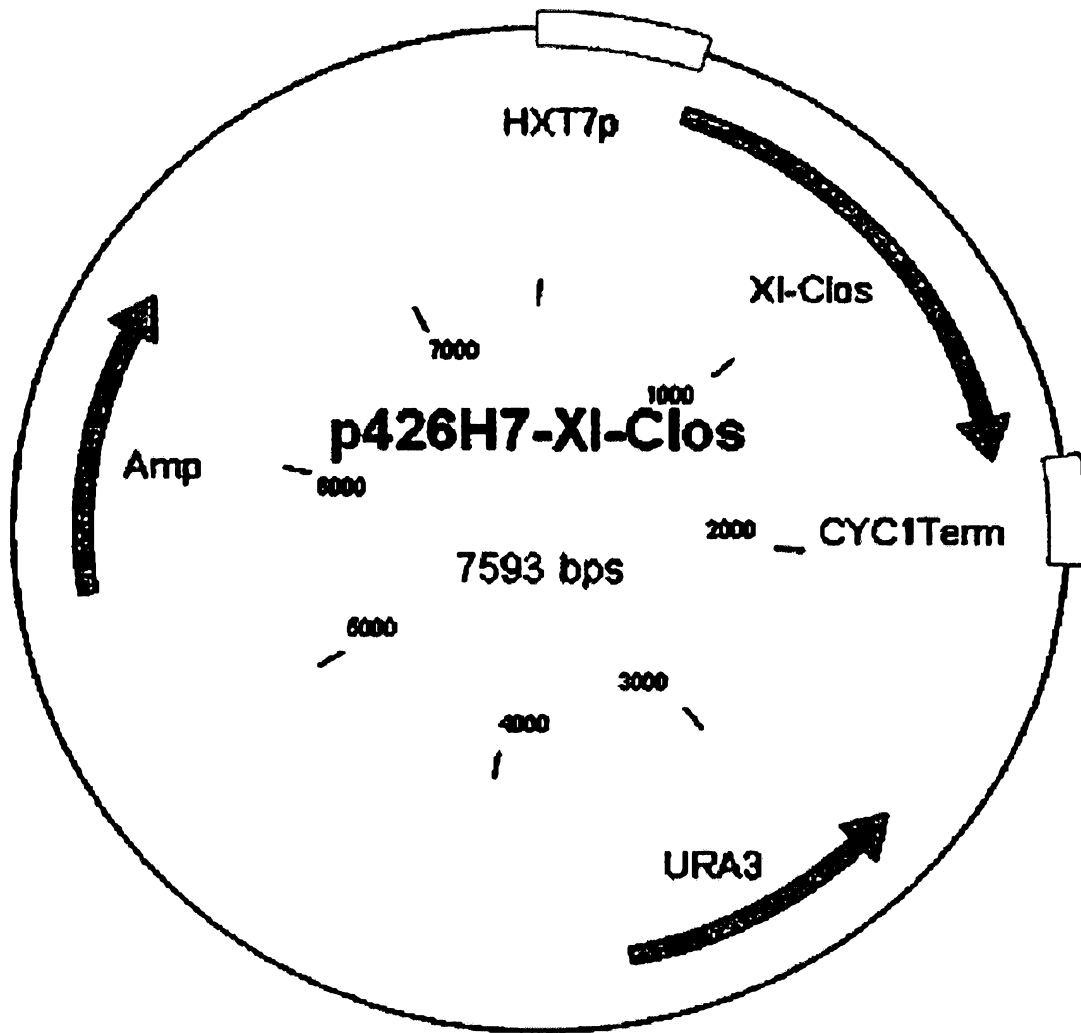


FIG. 4C

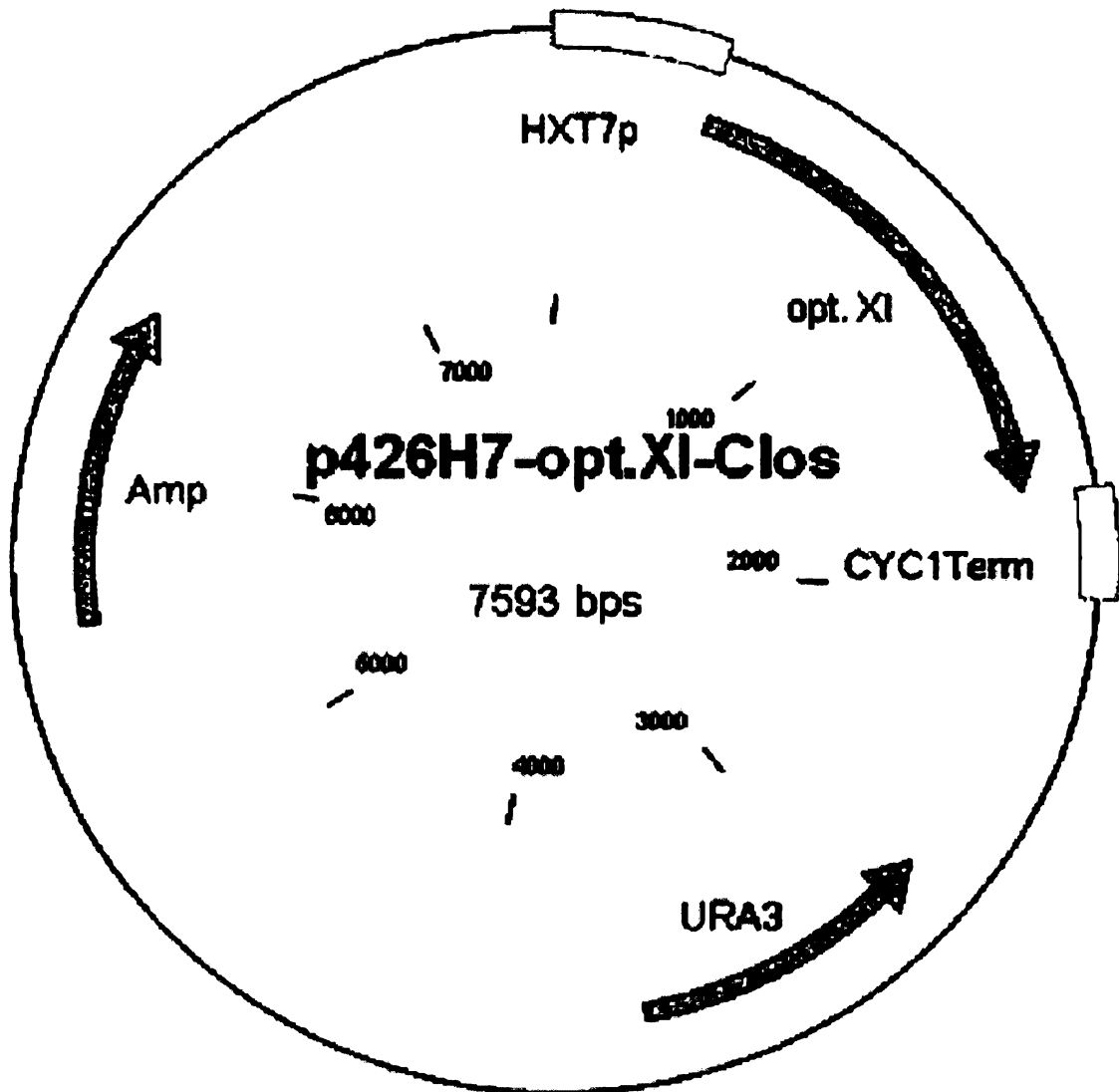
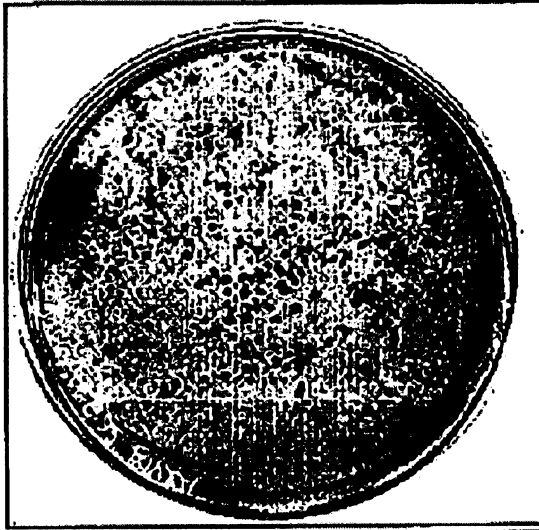
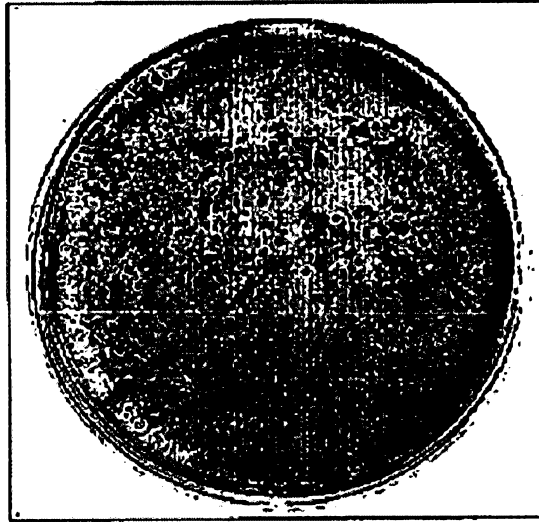


FIG. 5

C



B



A

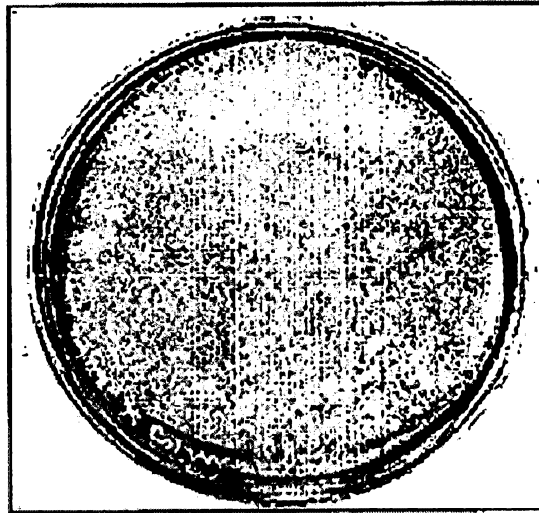


FIG. 6

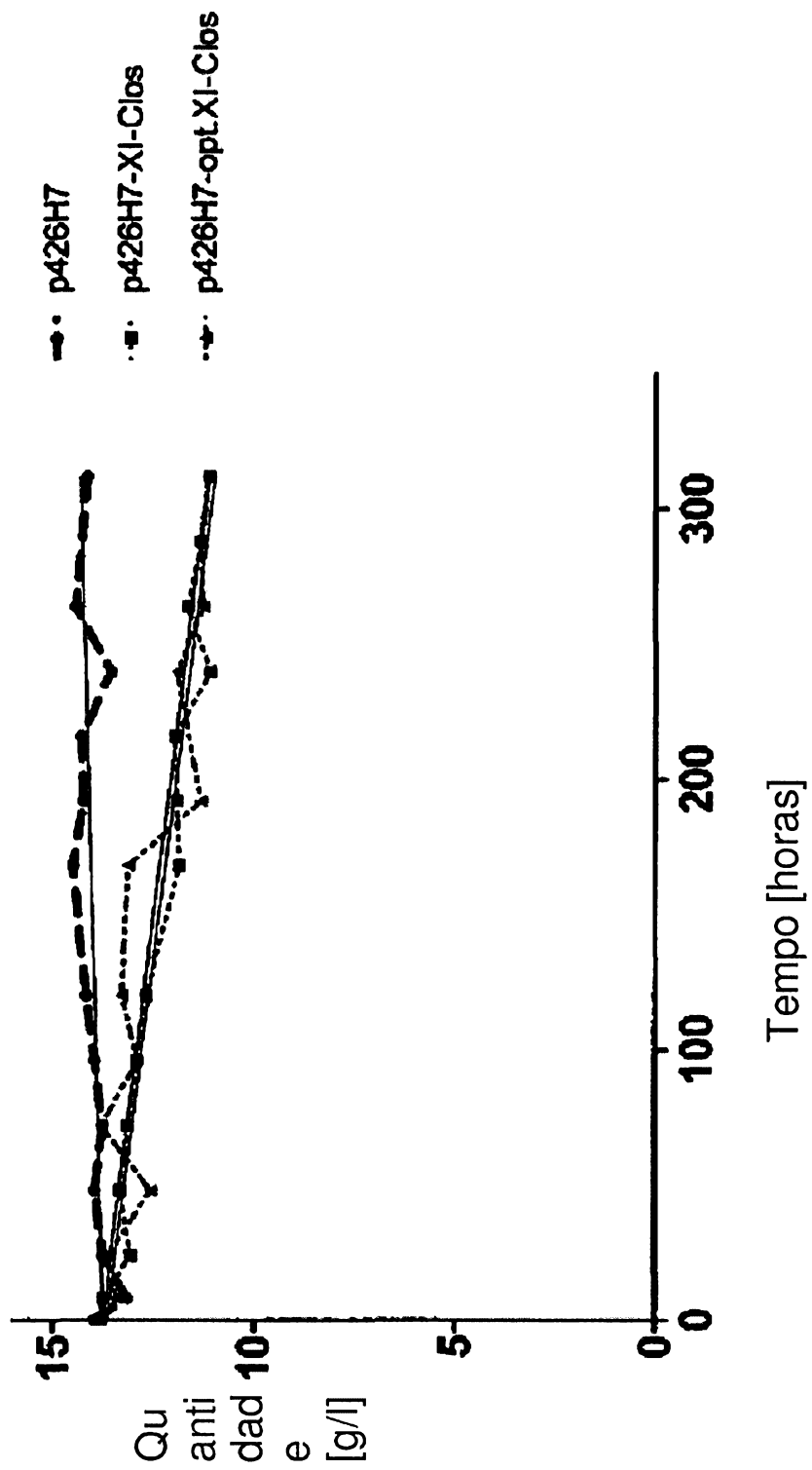


FIG. 7

