

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 319 757**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/61** (2006.01) **C12P 35/00** (2006.01)  
**C12N 15/54** (2006.01)  
**C12N 1/14** (2006.01)  
**C12N 1/19** (2006.01)  
**C12P 7/10** (2006.01)  
**C12P 7/20** (2006.01)  
**C12P 7/46** (2006.01)  
**C12P 7/54** (2006.01)  
**C12P 7/56** (2006.01)  
**C12P 13/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2003 PCT/NL2003/00049**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2003 WO03062430**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2003 E 03731853 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **24.01.2018 EP 1468093**

54 Título: **Fermentación de azúcares de pentosa**

30 Prioridad:

**23.01.2002 EP 02075266**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:

**22.05.2018**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
Het Overloon 1  
6411 TE Heerlen, Limburgo, NL**

72 Inventor/es:

**OP DEN CAMP, HUBERTUS JOHANNES MARIE;  
HARHANGI, HARRY RAMANOEDJ;  
VAN DER DRIFT, CHRISTIAAN y  
PRONK, JACOBUS THOMAS**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 319 757 T5

## DESCRIPCIÓN

Fermentación de azúcares de pentosa

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a células huéspedes transformadas mediante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa isomerasa eucariótica. La xilosa isomerasa se expresa en la célula huésped para conferir la capacidad de isomerizar xilosa a xilulosa. La célula huésped se usa en un proceso para la producción de etanol y otros productos de fermentación mediante la fermentación de un medio con pentosa. La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que codifican xilosas isomerasas eucarióticas.

15 Antecedentes de la invención

[0002] El consumo a gran escala de los combustibles fósiles tradicionales (combustibles a base de petróleo) en las últimas recientes décadas ha contribuido a generar altos niveles de contaminación. Además, la percepción de que las reservas mundiales de petróleo no son ilimitadas, combinada con la creciente conciencia medioambiental, han impulsado nuevas iniciativas para investigar la viabilidad de combustibles alternativos tales como el etanol, lo cual podría significar entre un 60-90% de reducción en la producción de CO<sub>2</sub>. Aunque el etanol derivado de biomasa se puede producir mediante la fermentación de azúcares hexosa, la cual se obtiene de muchas fuentes diferentes, hasta ahora, no obstante, los sustratos para la producción a escala industrial o el alcohol combustible son azúcar de caña y almidón de maíz. El inconveniente de estos sustratos es su alto coste.

[0003] Aumentar la producción de etanol requiere la capacidad de utilizar materias primas de coste inferior. Actualmente, sólo la biomasa lignocelulósica proveniente de plantas estaría disponible como materia prima en cantidades suficientes como para sustituir los brotes utilizados en la producción de etanol. Los azúcares fermentables de materiales lignocelulósicos más importantes son la glucosa y la xilosa, constituyendo respectivamente alrededor de un 40% y un 25% de lignocelulosa. Sin embargo, la mayoría de las levaduras susceptibles de fermentación alcohólica, como la *Saccharomyces cerevisiae*, no pueden usar la xilosa como fuente de carbono. Adicionalmente, no hay ningún organismo conocido que pueda fermentar xilosa en etanol tanto con un alto rendimiento como con una alta productividad de etanol. Para permitir la producción comercial de etanol a partir de hidrolizado de lignocelulosa, sería necesario un organismo que posea estas dos propiedades. Por lo tanto, un objetivo de la invención es proveer una levadura que sea capaz de tanto la fermentación alcohólica como de usar xilosa como fuente de carbono.

[0004] La D-xilosa es metabolizable por numerosos microorganismos como bacterias entéricas, algunas levaduras y hongos. En la mayoría de las xilosas que utilizan bacterias, la xilosa es directamente isomerizada a D-xilulosa por xilosa (glucosa) isomerasa (XI). Los hongos filamentosos y las levaduras, sin embargo, no son aptos para esta isomerización de un solo paso y reducen primero xilosa a xilitol mediante la acción de la xilosa reductasa (XR), después de lo cual el xilitol se convierte en xilulosa mediante xilitol dehidrogenasa (XDH). La primera fase requiere NAD(P)H como un cofactor, mientras que la segunda fase requiere NAD<sup>+</sup>. La xilulosa que se produce entra posteriormente en la ruta de los fosfatos de pentosa (PPP) después de ser fosforilada mediante xilulosa quinasa (XK). La fermentación anaeróbica de xilosa en etanol no es posible en organismos con una xilosa reductasa (XR) estrictamente dependiente de NADPH. Esto ocurre porque el xilitol deshidrogenasa (XDH) es estrictamente dependiente de NAD<sup>+</sup>, dando como resultado un desequilibrio de redox (es decir, depleción NAD<sup>+</sup>). Para resolver el desequilibrio de redox bajo condiciones anaeróbicas, el organismo produce subproductos tales como glicerol y xilitol. De forma similar, la producción aeróbica de β-lactamas en xilosa también está influenciada negativamente en comparación con la producción de β-lactama en glucosa. Una probable causa de estos bajos rendimientos es nuevamente una demanda relativamente alta de reducir equivalentes en forma de NADPH en esta ruta, en comparación con el uso de glucosa (W.M. van Gulik et al. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 68, n° 6, 20 junio, 2000).

[0005] Con el paso de los años se ha intentado en muchas ocasiones introducir el metabolismo de la xilosa en *S. cerevisiae* y levaduras similares, como se ha reseñado en Zaldivar et al. (2001, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 17-34). Un enfoque trata la expresión de genes que codifican una xilosa (aldosa) reductasa y un xilitol deshidrogenasa, p. ej. el *XYL1* y el *XYL2* de *Pichia stipitis*, en *S. cerevisiae* (US 5.866.382; WO 95/13362; y WO 97/42307). Aunque este enfoque permite el crecimiento de *S. cerevisiae* en xilosa, generalmente ello conlleva a una baja productividad y/o rendimiento del etanol, al igual que a una alta producción de xilitol, principalmente como resultado del desequilibrio de redox entre XR y XDH.

[0006] La expresión de una XI en *S. cerevisiae* o una levadura afín o en hongos filamentosos eludiría el desequilibrio de redox y su consiguiente producción y excreción de xilitol. Se han insertado genes de xilosa isomerasa de diferentes bacterias en *S. cerevisiae*, no obstante, la expresión de XIs procarióticas mesofílicas en *S. cerevisiae* no condujo a una XI activa (Amore and Hollenberg, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 7515; Amore et al., 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 351-357; Chan et al., 1986, *Biotechnol. Lett.* 8: 231-234; Chan et al.,

1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 524-528; Ho et al., 1983, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 42: 2167; Hollenberg, 1987, EBC-Symposium on Brewer's Yeast, Helsinki (Finlandia), 24-25 Nov 1986; Sarthy et al., 1987, Appl. Environ. Microbiol. 53: 1996-2000; Ueng et al., 1985, Biotechnol. Lett. 7: 153-158). Sin embargo, dos XIs de bacterias termófilas expresadas en *S. cerevisiae* mostraron una actividad específica de 1  $\mu\text{mol}$  por minuto por  $\text{mg}^{-1}$  a 85°C (Bao et al., 1999, Weishengwu-Xuebao 39: 49-54; Walfridson et al., 1996, Appl. Environ. Microbiol. 61: 4184-4190). No obstante, a una temperatura fisiológica para *S. cerevisiae* (20-35°C) sólo falta un pequeño porcentaje de esta actividad, lo cual no es suficiente para conseguir una fermentación alcohólica de xilosa eficaz. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de ácidos nucleicos que codifiquen una XI, la cual pueda ser expresada en levaduras para proporcionar suficiente actividad XI bajo condiciones fisiológicas para permitir el uso de xilosa como fuente de carbono.

### Descripción de la invención

#### Definiciones

##### Xilosa isomerasa

[0007] La enzima "xilosa isomerasa" (EC 5.3.1.5) se define aquí como una enzima que cataliza la isomerización directa de D-xilosa a D-xilulosa y viceversa. La enzima también es conocida como una D-xilosa cetoisomerasa. Algunas xilasas isomerasas también son capaces de catalizar la conversión entre D-glucosa y D-fructosa y en consecuencia a veces se hace referencia a ellas como glucosa isomerasa. Las xilasas isomerasas requieren magnesio como cofactor. Las xilasas isomerasas de la invención pueden ser definidas además por su secuencia de aminoácidos como se describe aquí abajo. Asimismo las xilasas isomerasas se pueden definir por las secuencias de nucleótidos que codifican la enzima, al igual que por secuencias de nucleótidos que hibridan a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una xilosa isomerasa como se describe aquí abajo.

[0008] Una unidad (U) de actividad de xilosa isomerasa se define aquí como la cantidad de enzimas que producen 1 nmol de xilulosa por minuto, en una mezcla reactiva que contiene un tampón de 50 mM de fosfato (pH 7.0), 10 mM de xilosa y 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , a 37°C. La xilulosa formada se determinó por el método de Dische y Borenfreund (1951, J. Biol. Chem. 192: 583-587) o por HPLC como se describe en los ejemplos.

##### Identidad y similitud de secuencia

[0009] La identidad de secuencia se define aquí como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptidos o proteínas) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos (polinucleótidos), determinada al comparar las secuencias. En la técnica, "identidad" significa también el grado de relación secuencial entre las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, según el caso, determinado mediante la combinación entre las series de caracteres de estas secuencias. La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus aminoácidos sustitutos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. "Identidad" y "similitud" se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero no sin limitarse a los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds. Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) ).

[0010] Los métodos preferidos para determinar la identidad son diseñados para dar la mayor correspondencia entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar identidad y similitud están codificados en programas informáticos abiertos al público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar identidad y similitud entre dos secuencias incluyen p. ej. el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1):387 (1984) ), BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible para el público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). Para determinar la identidad se puede usar también el bien conocido algoritmo de Smith Waterman.

[0011] Los parámetros preferidos para la comparación de la secuencia polipeptídica incluyen lo siguiente: Algoritmo: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970) ); Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992); Penalización de Espacio: 12; y Penalización de Longitud de Espacio: 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible al público como el programa "Ogap" del Genetics Computer Group, ubicado en Madison, WI. Los parámetros mencionados son los parámetros predefinidos para las comparaciones de aminoácidos (sin penalización para espacios terminales).

[0012] Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen lo siguiente: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: correspondencias=+10; no correspondencias=0; Penalización de Espacio: 50; Penalización de Longitud de Espacio: 3. Están disponibles en

el programa Gap del Genetics Computer Group, ubicado en Madison, Wis. Arriba se dan los parámetros por defecto para las comparaciones de ácidos nucleicos. Opcionalmente, en el proceso de determinar el grado de similitud de aminoácidos, el experto en la materia también puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", como deducirán los expertos en la materia. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas es: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales hidróxilo-alifáticas es: serina y treonina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales las cuales contienen amida es: asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas es: fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales básicas es: lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos con cadenas laterales con azufre es: cisteína y metionina. Los grupos preferidos de sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Las variantes sustitutivas de la secuencia de aminoácidos que se exponen aquí son aquellas en las que al menos un residuo de las secuencias expuestas ha sido eliminado y se ha insertado en su lugar un residuo diferente. Preferiblemente, el cambio de aminoácido será conservador. Las sustituciones conservadoras preferidas para cada uno de los aminoácidos naturales en su origen son las siguientes: Ala por ser; Arg por lys; Asn por gln o his; Asp por glu; Cys por ser o ala; Gln por asn; Glu por asp; Gly por pro; His por asn o gln; Ile por leu o val; Leu por ile o val; Lys por arg; gln o glu; Met por leu o ile; Phe por met, leu o tyr; Ser por thr; Thr por ser; Trp por tyr; Tyr por trp o phe; y, Val por ile o leu.

#### Secuencias de ácidos nucleicos hibridantes

[0013] Las secuencias nucleótidas que codifican xilosas isomerasas o xilulosa quinazas de la invención pueden definirse también por su capacidad para hibridar con las secuencias nucleótidas de SEQ ID n°. 2 o SEQ ID n°. 4, respectivamente, bajo condiciones de hibridación moderadas, o preferiblemente rigurosas. Las condiciones de hibridación rigurosas se definen aquí como condiciones que permiten hibridar una secuencia de ácidos nucleicos de al menos unos 25, mejor de aproximadamente 50 nucleótidos, 75 o 100 y más preferiblemente de alrededor de 200 o más nucleótidos, a una temperatura de unos 65°C en una solución que contenga aproximadamente 1 M de sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y lavar a 65°C en una solución que contenga aproximadamente 0.1 M de sal, o menos, preferiblemente 0.2 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Preferiblemente, la hibridación se realiza durante la noche, es decir, al menos durante 10 horas, y el lavado se realiza preferiblemente durante al menos una hora con un mínimo de dos cambios de la solución de lavado. Estas condiciones normalmente permiten la hibridación específica de secuencias que tienen aproximadamente un 90% o más de identidad de secuencia.

[0014] Las condiciones moderadas se definen aquí como condiciones que permiten hibridar secuencias de ácidos nucleicos de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de unos 200 o más nucleótidos, a una temperatura de aproximadamente 45°C en una solución que contenga aproximadamente 1 M de sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y lavar a temperatura ambiente en una solución que contenga aproximadamente 1 M de sal, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Preferiblemente, la hibridación se realiza durante la noche, es decir, durante al menos 10 horas, y el lavado se realiza preferiblemente durante al menos una hora con un mínimo de dos cambios de la solución de lavado. Estas condiciones normalmente permiten la hibridación específica de secuencias que tienen hasta un 50% de identidad de secuencia. El experto en la técnica será capaz de modificar estas condiciones de hibridación para identificar de forma específica secuencias que varíen en identidad entre un 50% y un 90%.

#### Operablemente enlazado

[0015] Tal y como se utiliza aquí, el término "operativamente enlazado" se refiere a una conexión de elementos polinucleótidos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "operablemente enlazado" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o intensificador está operativamente enlazado a una secuencia codificante si ello afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Operablemente enlazadas significa que las secuencias de ADN que se enlazan son normalmente contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, contiguas y en el marco de lectura.

#### Promotor

[0016] Como se utiliza en este caso, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, ubicados en sentido ascendente con respecto a la dirección de transcripción del sitio de inicio de la transcripción de los genes, y se identifica estructuralmente por la presencia de un centro de unión para la ANRpolimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluido, pero no limitado a sitios de enlace de factores de transcripción; sitios de unión de proteínas represoras y activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida para un experto en la técnica que actúe directa o indirectamente con el fin de regular la cantidad de

transcripción desde el promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor activo bajo muchas condiciones del entorno y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor activo bajo una regulación del entorno o de desarrollo.

## 5 Descripción detallada de la invención

[0017] En un primer aspecto la presente invención se refiere a una célula huésped transformada que tiene la capacidad de isomerizar xilosa a xilulosa. La capacidad de isomerizar xilosa a xilulosa se confiere a la célula huésped mediante la transformación de la célula huésped con un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos, que a su vez codifica una xilosa isomerasa. La capacidad de la célula huésped transformada para isomerizar xilosa a xilulosa es la isomerización directa de xilosa a xilulosa. Esto significa que la xilosa isomerizada a xilulosa en una única reacción catalizada por una xilosa isomerasa es diferente a la conversión en dos fases de xilosa a xilulosa a través de un xilitol intermediario así como catalizado por xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, respectivamente.

[0018] La secuencia de nucleótidos codifica una xilosa isomerasa que está preferiblemente expresada en forma activa en la célula huésped transformada. Así, la expresión de la secuencia de nucleótidos en la célula huésped produce una xilosa isomerasa con una actividad específica de al menos 10 U de actividad de xilosa isomerasa por mg de proteína a 25°C, preferiblemente de al menos 20, 25, 30, 50, 100, 200 o 300 U por mg a 25°C. La actividad específica de la xilosa isomerasa expresada en la célula huésped transformada se define aquí como la cantidad de unidades de actividad de xilosa isomerasa por mg de proteína de lisado libre de células de la célula huésped, por ej. un lisado libre de células de levadura. La determinación de la actividad de xilosa isomerasa, la cantidad de proteína y la preparación del lisado libre de células se describen en el Ejemplo 1. De forma alternativa, la actividad específica se puede determinar como se indica en el Ejemplo 4. Por consiguiente, la expresión de la secuencia de nucleótidos en la célula huésped produce una xilosa isomerasa con una actividad específica de al menos 50 U de actividad de xilosa isomerasa por mg de proteína a 30°C, preferiblemente de al menos 100, 200, 500, o 750 U por mg a 30°C.

[0019] Preferiblemente, la expresión de la secuencia de nucleótidos en la célula huésped produce una xilosa isomerasa con un  $K_m$  por xilosa, que es menos de 50, 40, 30 o 25 mM, más preferentemente, el  $K_m$  para la xilosa es aproximadamente de 20 mM o menos.

[0020] Una secuencia de nucleótidos que codifica la xilosa isomerasa puede ser seleccionada del grupo que consiste en: secuencias de nucleótidos que codifican una xilosa isomerasa que comprenden una secuencia de aminoácidos con al menos un 70, 80, 90, 95, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n°: 1, determinada usando un algoritmo Needleman y Wunsch, la matriz de comparación BLOSUM 62, una Penalización de Espacio de 12 y una Penalización de Longitud de Espacio de 4.

[0021] La secuencia de nucleótidos preferentemente codifica una xilosa isomerasa eucariótica, es decir, una xilosa isomerasa con una secuencia de aminoácidos idéntica a la de una xilosa isomerasa que se encuentra de forma natural en un organismo eucariótico. La expresión de una xilosa isomerasa eucariótica aumenta la probabilidad de que la xilosa isomerasa se exprese en forma activa en una célula huésped eucariótica como una levadura, a diferencia de las xilosas isomerases mesofílicas procarióticas. De forma más deseada, la secuencia nucleotídica codifica una xilosa isomerasa de plantas o una xilosa isomerasa fúngica (p. ej. de *Basidiomycete*). Con la mayor preferencia, no obstante, la secuencia nucleotídica codifica una xilosa isomerasa de un hongo anaeróbico, para aumentar más la probabilidad de expresión en forma enzimáticamente activa en una célula huésped eucariótica, en particular en levadura. Se prefieren mejor las secuencias de nucleótidos que codifican una xilosa isomerasa de un hongo anaeróbico que pertenezca a las familias *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Piromices*, *Orpinomyces*, o *Ruminomyces*.

[0022] Una célula huésped para la transformación mediante una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa es preferentemente un huésped capaz de transportar de forma activa o pasiva xilosa dentro de la célula. La célula huésped contiene preferentemente glucólisis activa, la ruta de fosfatos de pentosa, y preferiblemente contiene actividad xilulosa quinasa de modo que la xilulosa isomerizada de xilosa se puede metabolizar a piruvato. Además, el huésped contiene preferiblemente enzimas para la conversión de piruvato a un producto de fermentación deseado tal como etanol, etileno o ácido láctico. Una célula huésped preferida es una célula huésped naturalmente capaz de la fermentación alcohólica, preferentemente, de la fermentación alcohólica anaeróbica. Preferiblemente, la célula huésped tiene además una alta tolerancia al etanol y a los ácidos orgánicos, como el ácido láctico, el ácido acético o el ácido fórmico y los productos de degradación de azúcar tales como el furfural y el hidroximetilfurfural. Cualquiera de estas características o actividades de la célula huésped pueden encontrarse de forma natural en la célula huésped o se pueden introducir o modificar mediante modificación genética. Una célula huésped adecuada es un microorganismo como una bacteria o un hongo, no obstante, lo más adecuado como célula huésped son las levaduras o los hongos filamentosos.

[0023] Las levaduras se definen aquí como microorganismos eucarióticos e incluyen todas especies de la subdivisión Eumicotina (Alexopoulos, C. J., 1962, en: Introductory Mycology, John Wiley & Sons, Inc., New York)

que predominantemente crecen en forma unicelular. Las levaduras pueden crecer o bien mediante injerto de un tallo unicelular o bien mediante fisión del organismo. Las levaduras preferidas para ser células huéspedes pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, y *Yarrowia*. Preferiblemente, la levadura es capaz de una fermentación anaeróbica, y más preferiblemente de una fermentación alcohólica anaeróbica.

[0024] Los hongos filamentosos se definen aquí como microorganismos eucarióticos que incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumicotina. Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo compuesto por quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos de la presente invención son morfológica, fisiológica y genéticamente diferentes de las levaduras. El crecimiento vegetativo por hongos filamentosos se produce mediante alargamiento hifal y el catabolismo de carbono de la mayoría de hongos filamentosos se produce de forma estrictamente aeróbica. Los hongos filamentosos preferidos para ser células huéspedes pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* y *Penicillium*.

[0025] Con el paso de los años se han hecho sugerencias para introducir varios organismos para la producción de bioetanol proveniente de azúcares de cosechas. En la práctica, sin embargo, los procesos de producción de bioetanol más importantes han continuado usando las levaduras del género *Saccharomyces* como productoras de etanol. Esto se debe a las muchas características atractivas de la especie *Saccharomyces* para procesos industriales, es decir, alta tolerancia al ácido, al etanol y a la osmolaridad; capacidad de crecimiento anaeróbico, y por supuesto alta capacidad de fermentación alcohólica. Las especies de levadura preferidas como células huéspedes incluyen *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *K. fragilis*.

[0026] La célula huésped se transforma con un constructo de ácidos nucleicos como se define más detalladamente abajo, y pueden comprender una única copia, aunque sería mejor múltiples copias, del constructo de ácidos nucleicos. El constructo de ácidos nucleicos se puede mantener de forma episomal y comprender así una secuencia de replicación autónoma, tal como una secuencia ARS. Los constructos adecuados de ácidos nucleicos episómicos pueden estar basados, p. ej., en los plásmidos de levadura 2 $\mu$  o pKD1 (Fleer et al., 1991, *Biotechnology* 9:968-975). Preferiblemente, no obstante, el constructo de ácidos nucleicos está integrado en una o más copias del genoma de la célula huésped. La integración en el genoma de la célula huésped puede ocurrir al azar mediante recombinación ilegítima, pero es más preferible que el constructo de ácidos nucleicos se integre en el genoma de la célula huésped mediante recombinación homóloga, como bien se conoce en la técnica de genética molecular fúngica (ver p. ej. WO 90/14423, EP-A-0 481 008, EP-A-0 635 574 y US 6.265.186).

[0027] En una célula huésped transformada según la invención, el constructo de ácidos nucleicos confiere a la célula huésped la capacidad de isomerizar xilosa a xilulosa, lo que confiere a la célula huésped la capacidad de aumentar la xilosa como fuente de carbono, preferiblemente como fuente de carbono única, y preferiblemente bajo condiciones anaeróbicas, a través de la cual preferentemente el huésped transformado no produce esencialmente xilitol, por ej. el xilitol producido está por debajo del límite de detección o por ej. es menor de un 5, 2, o un 1% del carbono consumido en una base molar. La célula huésped transformada tiene la capacidad de aumentar la xilosa como única fuente de carbono a una velocidad de al menos 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 o 0.2 h<sup>-1</sup>. La célula huésped transformada de la invención expresa así una xilosa isomerasa a un nivel de actividad específico definido arriba.

[0028] Una célula huésped puede comprender modificaciones genéticas adicionales que resulten en una o más de las características seleccionadas del grupo que consiste en (a) mayor transporte de xilosa a la célula huésped; (b) mayor actividad de xilulosa quinasa; (c) mayor flujo de la ruta de fosfatos de pentosa; (d) menor sensibilidad para la represión catabólica; (e) mayor tolerancia al etanol, la osmolaridad o los ácidos orgánicos; y, (f) menor producción de subproductos. Los subproductos se entienden como otras moléculas contenedoras de carbono diferentes del producto de fermentación deseado e incluyen p. ej. xilitol, glicerol y/o ácido acético. Tales modificaciones genéticas pueden introducirse mediante mutagénesis tradicional, cribado y/o selección de la mutación deseada. De forma alternativa, las modificaciones genéticas pueden consistir en una sobreexpresión de genes endógenos y/o una expresión de unos genes heterólogos y/o la inactivación de genes endógenos. Los genes son escogidos preferiblemente de genes que codifican una hexosa o son transportadores de pentosa; una xilulosa quinasa tal como los genes de xilulosa quinasa de *S. cerevisiae* (*XKS1* Deng and Ho, 1990, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24-25:193-199) o *Piromyces* (*xyIB*, es decir SEQ ID n°. 4); una enzima de la ruta de fosfatos de pentosa tal como una transaldolasa (*TAL1*) o una transcetolasa (*TKL1*) (véase p. ej. Meinander et al., 1995, *Pharmacol. Toxicol. Suppl.* 2: 45) enzimas glicolíticas, enzimas etanológicas tales como deshidrogenasas de alcohol. Los genes endógenos preferidos para la inactivación incluyen un gen de hexosa quinasa, por ej. el gen de *S. cerevisiae* *HXK2* (véase Diderich et al., 2001, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1587-1593); los genes de *S. cerevisiae* *MIG1* o *MIG2*; genes de aldosa reductasa (no específicos) tales como el gen de *S. cerevisiae* *GRE3* (Traff et al., 2001, *Appl. Environm. Microbiol.* 67: 5668-5674); genes para enzimas implicadas en el metabolismo de glicerol tales como los genes de *S. cerevisiae* glicerolfosfato dehidrogenasa 1 y/o 2; u homólogos

(hibridizantes) de los genes en otras especies huésped. Otras modificaciones de células huéspedes preferidas para la fermentación de xilosa son analizadas en Zaldivar et al. (2001, *supra*).

[0029] En otro aspecto la invención se refiere a una célula huésped transformada para la producción de productos de fermentación, excepto de etanol. Este tipo de productos de fermentación no-etanólica incluyen en un principio cualquier producto químico de mayor o menor volumen que sea producible por un microorganismo eucariótico tal como una levadura o un hongo filamentoso. Tales productos de fermentación incluyen p. ej. ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, aminoácidos, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, antibióticos  $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas.

[0030] La transformación de células huéspedes con los constructos de ácidos nucleicos de la invención y la modificación genética adicional de células huéspedes, preferiblemente levaduras, como se ha descrito anteriormente, se pueden realizar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos son conocidos por ej. en manuales estándares, tales como Sambrook and Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, o F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Se conocen métodos para la transformación y modificación genética de células huéspedes fúngicas por ej. en EP-A-0 635 574, WO 98/46772, WO 99/60102 y WO 00/37671.

[0031] En otro aspecto la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia nucleótida, que a su vez codifica una xilosa isomerasa tal como se ha definido anteriormente, y ésta se usa para la transformación de una célula huésped, tal como se ha definido anteriormente. En el constructo de ácidos nucleicos, preferiblemente la secuencia de nucleótidos que codifica la xilosa isomerasa está operativamente enlazada a un promotor para el control y la iniciación de la transcripción de la secuencia nucleótida en una célula huésped tal y como se define abajo. El promotor, preferiblemente, es capaz de causar suficiente expresión de xilosa isomerasa en la célula huésped para conferir a la célula huésped la capacidad de isomerizar la xilosa a xilulosa. Preferiblemente, el promotor causa una actividad de xilosa isomerasa específica en la célula huésped tal como se ha definido anteriormente. Entre los promotores útiles en los constructos de ácidos nucleicos de la invención se incluyen ambos promotores constitutivos e inducibles naturales al igual que los promotores creados genéticamente. Un promotor preferido para su uso en la presente invención será además insensible a la represión catabólica (glucosa) y/o preferiblemente no requerirá xilosa para la inducción. Los promotores que tengan estas características están mucho más disponibles y son mucho más conocidos por el experto en la materia. Ejemplos adecuados de promotores de este tipo incluyen por ej. a los promotores de levadura de genes glicolíticos, tal como la fosfofructoquinasa de levadura (PPK), triosa fosfato isomerasa (TPI), gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa (GPD, TDH3 o GAPDH), piruvato-quinasa (PiK), fosfoglicerato-quinasa (PGK); se pueden encontrar más detalles sobre este tipo de promotores en (WO 93/03159). Otros promotores útiles son los promotores de genes que codifican proteínas ribosómicas, el promotor de gen de lactasa (LAC4), los promotores de alcohol-dehidrogenasa (ADH1, ADH4, y similares), y el promotor de enolasa (ENO). Otros promotores, tanto constitutivos como inducibles así como potenciadores o secuencias activadoras en sentido ascendente, serán conocidos por los expertos en la materia. Los promotores usados en los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser modificados, si se desea, para influir en sus características de control. Preferiblemente, el promotor usado en el constructo de ácidos nucleicos para la expresión de la xilosa isomerasa es homólogo a la célula huésped en la que se expresa la xilosa isomerasa.

[0032] Preferiblemente, en el constructo de ácidos nucleicos, el extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleótidos que codifica la xilosa isomerasa se enlaza operativamente a una secuencia de transcripción terminadora. Preferiblemente, la secuencia terminadora es operable en una célula huésped de elección, tales como p. ej. las especies de levadura de elección. En cualquier caso la elección del terminador no es un punto crítico, por ej. puede provenir de cualquier gen de levadura, aunque a veces los terminadores pueden funcionar con genes eucarióticos que no provienen de ninguna levadura. Además, preferiblemente, la secuencia de transcripción terminadora comprende una señal de poliadenilación.

[0033] Opcionalmente, puede estar presente un marcador seleccionable en el constructo de ácidos nucleicos. Tal y como se utiliza aquí, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica una característica o un fenotipo que permite la selección de o para una célula huésped que contenga al marcador. El gen marcador puede ser un gen de resistencia antibiótica a través del cual se pueda utilizar el antibiótico apropiado para seleccionar células transformadas de entre las células no transformadas. Ejemplos de marcadores de resistencia antibiótica adecuados incluyen, por ej., dihidrofolato-reductasa, higromicina-b-fosfotransferasa, 3'-O-fosfotransferasa II (resistencia a canamicina, neomicina y G418). Aunque los marcadores de resistencia antibiótica puedan ser más convenientes para la transformación de células huéspedes poliploides, preferiblemente, no obstante, se usan marcadores de resistencia no antibiótica, así como marcadores auxotróficos (URA3, TRP1, LEU2) o el gen *de S. pombe* TPI (descrito por Russell P R, 1985, gen 40, 125-130). En una forma de realización preferida las células huéspedes transformadas con los constructos de ácidos nucleicos son genes marcadores libres. Se exponen métodos para construir genes marcadores recombinantes de células huéspedes microbianas libres en EP-A-0 635 574, basados en el uso de marcadores bidireccionales tales como el gen *A. nidulans* amdS (acetamidasa) o los genes de levadura URA3 y LYS2. De forma alternativa, un marcador de diagnóstico tal como la proteína

verde fluorescente, *lacZ*, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, o beta-glucuronidasa, puede ser incorporado en los constructos de ácidos nucleicos de la invención permitiendo cribar las células transformadas.

5 [0034] Algunos otros elementos opcionales que pueden estar presentes en los constructos de ácidos nucleicos de la invención incluyen, pero no se limitan a, una o más secuencias líder, intensificadores, factores de integración, y/o genes indicadores, secuencias de intrón, centromeros, telomeros y/o secuencias de fijación matricial (MAR). Los constructos de ácidos nucleicos de la invención pueden comprender además una secuencia para la replicación autónoma, como una secuencia ARS. Los constructos de ácidos nucleicos episómicos adecuados pueden estar basados, por ej., en los plásmidos de levadura 2 $\mu$  o pKD1 (Fleer et al., 1991, Biotechnology 9:968-975). De forma alternativa, el constructo de ácidos nucleicos puede comprender secuencias para la integración, preferiblemente por recombinación homóloga. De este modo tales secuencias pueden ser secuencias homólogas al sitio objetivo para la integración en el genoma de la célula huésped. Los constructos de ácidos nucleicos de la invención pueden ser proporcionados de un modo conocido *per se*, que generalmente implica técnicas tales como restringir y conectar secuencias de ácidos nucleicos/ácido nucleico, para lo que se hace referencia a los manuales estándares, tales como Sambrook and Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3<sup>a</sup> edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, o F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

20 [0035] En otro aspecto, la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, que a su vez codifica una xilosa isomerasa. La molécula de ácido nucleico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

- 25 (a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido, las cuales comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50, 53, 54, 55, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, o un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n° 1;
- (b) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos, la cual tiene al menos un 50, 56, 57, 58, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, o un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n° 2;
- 30 (c) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida a una secuencia de moléculas de ácido nucleico de (a) o (b);
- (d) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (c) debido a la degeneración del código genético.

35 [0036] De forma alternativa, una molécula de ácido nucleico de (a) puede codificar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual tiene al menos un 67, 68, 69, 70, 80, 90, 95, 97, 98, o un 99% de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n° 1. Una molécula de ácido nucleico de (c) preferiblemente hibrida bajo condiciones moderadas, y más preferiblemente bajo condiciones rigurosas, como ya se ha definido arriba. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico proviene de una célula eucariota, más preferiblemente de un microorganismo eucariótico tal como un hongo, y de la forma más preferible de un hongo anaeróbico, tal como p. ej. algún hongo anaeróbico de los descritos anteriormente.

45 [0037] Otro aspecto más de la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, la cual codifica una xilulosa quinasa, preferiblemente una D-xilulosa quinasa. Una D-xilulosa quinasa (EC 2.7.1.17; también referida como una D-xiluloquinasa) se define aquí como una enzima que cataliza la conversión de D-xilulosa en xilulosa-5-fosfato. La molécula de ácido nucleico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

- 50 (a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 45, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, o un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n° 3;
- (b) moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos, la cual tiene al menos un 30, 37, 38, 39, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, o un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEC ID n° 4;
- 55 (c) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida a una secuencia de molécula de ácido nucleico de (a) o (b); y,
- (d) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (c) debido a la degeneración del código genético.

60 [0038] De forma alternativa, una molécula de ácido nucleico de (a) puede codificar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos, la cual tiene al menos un 64, 65, 66, 70, 80, 90, 95, 97, 98, o 99% de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n°3. Una molécula de ácido nucleico de (c) hibrida preferiblemente bajo condiciones moderadas, y más preferiblemente bajo condiciones rigurosas, como se ha definido arriba. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico proviene de una célula eucariota, más preferiblemente de un microorganismo eucariótico tal como un hongo, y de la forma más preferible de un hongo anaeróbico, tal como p. ej. los hongos anaeróbicos descritos anteriormente.

[0039] En otro aspecto la invención se refiere a procesos de fermentación donde las células huéspedes transformadas de la invención se usan para la fermentación de la fuente de carbono que comprende una fuente de xilosa, tal como xilosa. Además de una fuente de xilosa, la fuente de carbono en el medio de fermentación puede comprender también una fuente de glucosa. La fuente de xilosa o glucosa puede ser de xilosa o glucosa como tales o puede consistir en cualquier oligómero o polímero de carbohidratos que comprenda xilosa o unidades de xilosa o de glucosa de carbohidratos de este tipo se pueden añadir carbohidrasas apropiadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y similares) al medio de fermentación, o ésta también se puede producir por la célula huésped transformada. En este caso, la célula huésped transformada se puede crear genéticamente para producir y excretar carbohidrasas de este tipo. En un proceso deseado, la célula huésped transformada fermenta tanto la xilosa como la glucosa, preferiblemente de forma simultánea, en cuyo caso se usa preferiblemente una célula huésped transformada insensible a la represión de glucosa para prevenir el crecimiento diauxico. Además de una fuente de xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá también el ingrediente apropiado requerido para el crecimiento de la célula huésped transformada. Las composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras son bien conocidas en la técnica.

[0040] El proceso de fermentación es un proceso para la producción de un producto de fermentación tal como etanol, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, aminoácidos, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, antibióticos  $\beta$ -lactámicos tales como Penicilina G, Penicilina V y derivados fermentativos de los mismos, y cefalosporinas. El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aeróbico o anaeróbico. Un proceso de fermentación anaeróbico se define aquí como un proceso de fermentación que funciona en ausencia de oxígeno o donde sustancialmente no se consume oxígeno, por ej., menos de 5 mmol/L/h, y donde las moléculas orgánicas sirven a la vez de donantes de electrones y de aceptadores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en la glucólisis y la formación de biomasa no puede ser oxidado por fosforilación oxidante. Para resolver este problema muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados, como aceptado de electrones y de hidrógeno, regenerando de este modo  $\text{NAD}^+$ . Así, en un proceso de fermentación anaeróbica deseado el piruvato se usa como un aceptador de electrones (y de hidrógeno) y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, ácido láctico, 1,3-propanodiol, etileno, ácido acético o ácido succínico.

[0041] El proceso de fermentación se empieza preferiblemente a una temperatura óptima para la célula huésped transformada. Así, para la mayoría de levaduras o de células huéspedes fúngicas, el proceso de fermentación se realiza a una temperatura inferior a 38°C. Para levaduras o células huéspedes filamentosas fúngicas, el proceso de fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura inferior a 35, 33, 30 o 28°C y a una temperatura superior a 20, 22, o 25°C.

[0042] Un proceso deseado es un proceso para la producción de etanol, para lo cual éste proceso comprende las fases de: (a) fermentación de un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula huésped transformada, tal como se ha definido anteriormente, por la cual la célula huésped fermenta xilosa a etanol; y, opcionalmente, (b) recuperación del etanol. El medio de fermentación también puede comprender una fuente de glucosa, la cual también se fermenta a etanol. Preferiblemente, en el proceso la productividad de etanol volumétrico es de al menos 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0 o 10.0 g de etanol por litro por hora. Preferiblemente, el rendimiento de etanol en xilosa y/o glucosa en el proceso es de al menos un 50, 60, 70, 90, 95 o 98%. El rendimiento de etanol se define aquí como un porcentaje del rendimiento teórico, el cual para glucosa y xilosa es de 0.51 g de etanol por g de glucosa o xilosa.

[0043] En otro aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación seleccionado del grupo que consiste en ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, aminoácidos, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, antibióticos  $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas. Preferiblemente, el proceso comprende las fases de: (a) fermentación de un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula huésped transformada, tal y como se ha definido arriba, por la cual la célula huésped fermenta xilosa al producto de fermentación, y, opcionalmente, (b) recuperación del producto de fermentación. En un proceso deseado, el medio también contiene una fuente de glucosa.

#### Descripción de las figuras

[0044] Figura 1. Curvas de crecimiento del transformante de *S. cerevisiae* desarrollado en un medio que contiene 25 mM de galactosa y 100 mM de xilosa como fuente de carbono. El transformante pYes contiene un vector de expresión de levadura sin inserción. Los transformantes 14.3, 16.2.1 y 16.2.2 son transformados con el vector pYES, que contiene la secuencia codificante de xilosa isomerasa de *Piromyces* esp. E2.

**Ejemplos****Ejemplo 1**5 Clonación de xilanas isomerasa de *Piromyces* y ADNcs de xilulosa quinasaOrganismo y condiciones de crecimiento

10 [0045] El hongo anaeróbico *Piromyces* esp. E2 (ATCC 76762), aislado de heces de un elefante indio, se desarrolló de forma anaeróbica bajo N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80 %/20 %) a 39°C en un medio M2 suplementado con varias fuentes de carbono (24). Las fuentes de carbono usadas fueron Avicel (celulosa microcristalina de tipo PH 105, Serva, Alemania), fructosa o xilosa (todos 0,5%, p/v). Después de que el crecimiento cesara, según se juzgó por la producción de hidrógeno, las células se cosecharon por centrifugado (15.000 x g, 4°C, 15 min;) o por filtración sobre gasa de nilón (con un tamaño de poro de 30 µM).

15 Preparación de extracto libre de célula

20 [0046] Las células micóticas se lavaron con agua desionizada para eliminar componentes del medio. Los extractos libres de la célula se prepararon mediante congelación de las células en nitrógeno líquido y trituración posterior con perlas de vidrio (de 0.10-0.11 mM de diámetro) en un mortero. Se añadió un tampón de Tris/HCl (100 mM, pH 7.0) al polvo (1:1, p/v) y después de descongelarse la suspensión durante 15 min, ésta se centrifugó (18.000 x g, 4°C, 15 min). El sobrenadante claro se usó como una fuente de enzimas intracelulares.

25 Ensayos enzimáticos

30 [0047] La actividad de xilosa isomerasa se evaluó a 37°C en una mezcla reactiva que contenía un tampón de 50 mM de fosfato (pH 7.0), 10 mM de xilosa, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y una cantidad adecuada de extracto libre de célula. La cantidad de xilulosa formada se determinó mediante el método de cisteína-carbazol (9). Las actividades de xilulosa quinasa y xilosa reductasa se evaluaron como se describe por Witteveen et al. (28). Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzimas que producen 1 nmol de xilulosa por minuto según las condiciones del ensayo. La xilulosa formada se determinó por el método de Dische y Borenfreund (Dische and Borenfreund, 1951, J. Biol. Chem. 192, 583-587) o por HPLC, usando una columna BioRad HPX-87N accionada a 80°C y eluada a 0.6 ml/min, usando 0.01 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, como eluente. La xilosa y la xilulosa se detectaron con un detector de Índice de Refracción a una temperatura interna de 60°C.

35 [0048] La actividad específica se expresa en unidades por mg de proteína. La proteína se determinó con el reactivo de proteínas Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad, Richmond, CA, EEUU) con  $\gamma$ -globulina bovina como estándar.

40 Secuenciación aleatoria de una genoteca de ADNc de *Piromyces* esp. E2

45 [0049] Se usó la genoteca de ADNc construida en el vector lambda ZAPII como se ha descrito previamente (2). Una parte alícuota de esta genoteca se convirtió en clones de PBluescript SK mediante excisión de masa con el fago ExAssist auxiliar (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Los clones seleccionados de forma aleatoria fueron secuenciados con el cebador inverso M13 para obtener secuencias de 5' partes. Los ADNcs incompletos se usaron para sintetizar sondas, las cuales se usaron para volver a cribar la genoteca. Para obtener secuencias de longitud total se generaron subclones en pUC18. La secuenciación se realizó con el secuenciador automatizado ABI prism 310 y con el kit secuenciador de ADN de reacción preparada para el ciclo de secuenciación del terminador de dRhodamine (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

50 Resultados

55 [0050] Los clones seleccionados de una genoteca de ADNc del hongo anaeróbico *Piromyces* esp. E2 se ordenaron de forma aleatoria, de ahí resultaron dos clones (pH97 y pAK44) cuyas secuencias mostraron una alta homología con la xilosa isomerasa y los genes D-xiluloquinasa, respectivamente. Se analizaron los clones detalladamente.

60 [0051] El clon pH97 no contenía un ORF (marco de lectura abierto, del inglés Open Reading Frame) completo y en consecuencia se volvió a cribar la genoteca de ADNc con una sonda diseñada en base a los datos de secuencia del clon pH97. Esto resultó en un clon pR3 con un inserto de 1669 pares de bases. Se podría identificar un ORF que codifique una proteína de 437 aminoácidos con una alta similitud con las xilosas isomerasas. Aunque la región no codificante 5' comprende sólo 4 pares de bases, el presunto principio de residuo de metionina se adaptó bien en una alineación de secuencias conocidas de xilosa isomerasa. La región no codificante 3' tuvo 351 pares de bases de longitud y un alto contenido de AT, lo que es típico para los hongos anaeróbicos. El ORF contenido en los aminoácidos se mostró como un factor importante para la interacción con el sustrato (tríada catalítica His 102, Asp 105, Asp 340 y Lys 235) y la unión de magnesio (Glu 232) (14, 26).

Además estaban presentes los dos modelos de firma (residuos 185-194 y 230-237) desarrollados para las xilosas isomerases (20). La xilosa isomerasa (XylA) de *Piromyces* esp. E2 muestra la máxima homología con las enzimas de *Haemophilus influenza* (52 % de identidad, 68 % de similitud) y *Hordeum vulgare* (49 % de identidad, 67 % de similitud). El polipéptido deducido de la secuencia de ADNc se corresponde con una masa molecular de 49,395 Da y tiene un pl calculado de 5,2.

[0052] El segundo clon, pAK44, tuvo un inserto de 2041 pares de bases y contenía un ORF completo que codificaba una proteína de 494 aminoácidos con un peso molecular de 53.158 Da y un pl de 5.0. La primera metionina se procesó mediante una región no codificante de 111 pares de bases 5', mientras que la región no codificante 3' comprendía 445 pares de bases. Ambas regiones son ricas en AT. Las búsquedas BLAST y FASTA revelaron una alta similitud con xiluloquinasas. Las dos regiones de consenso de fosfato definidas por Rodríguez-Peña et al. (22) se encontraron en las posiciones 6-23 y 254-270, como se muestra en una alineación parcial. Además se identificaron las firmas para esta familia de carbohidrato quinasa como se describen en la base de datos Prosite (131-145 y 351-372). La xiluloquinasa (Xy1B) de *Piromyces* esp. E2 presentó la máxima homología con la proteína Xy1B de *Haemophilus influenza* (46 % de identidad, 64 % de similitud).

## **Ejemplo 2**

### Construcción de vectores de expresión de levaduras

#### Expresión de xilosa isomerasa de *Piromyces* esp. E2 en *Saccharomyces cerevisiae*

[0053] Se usó ADNc de *Piromyces* esp. E2 en una reacción PCR con polimerasa *Pfu* (Stratagene). Los cebadores se diseñaron usando las secuencias de los extremos 5' y 3' del gen de xilosa isomerasa y también contenían un Sfi I y un sitio de restricción de XbaI. El producto de PCR se clonó en el vector pPICZ $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para obtener el gen de xilosa isomerasa, se digirió el vector pPICZ $\alpha$  con EcoRI y XbaI. El producto de digestión se ligó en el vector pYes2 (Invitrogen). El plásmido pYes2 junto con el gen de xilosa isomerasa se transformó en *Saccharomyces cerevisiae* (stam BJ1991, donación de Beth Jones, UvA). El genotipo de esta cepa es: *mat $\alpha$* , *leu2*, *trp1*, *ura 3-251*, *prb1-1122* y *pep4-3*.

Los transformantes fueron colocados en placas SC (0.67% de medio YNB + 0.05% de L-Leu + 0.05% de L-Trp + 2% de glucosa + 2% de agarosa). Las células no transformadas no pueden desarrollarse en estas placas.

#### Inducción

[0054] Las células de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas se desarrollaron en un medio de glucosa a 25°C durante 72 h (se puede utilizar rafinosa como medio alternativo a la glucosa). Las células se cosecharon y se resuspendieron en un medio SC con galactosa en vez de glucosa. Después de 8 h de inducción se cosecharon y lisaron las células usando perlas de vidrio (de 0.10-0.11 mM de diámetro) y un "tampón de suspensión" (un tampón de 50mM de fosfato + 5% glicerol + inhibidor de proteasa). Después de la lisis se centrifugó la mezcla (18,000 x g, 4°C, 15 min). El sobrenadante claro se usó para determinar la actividad de xilosa isomerasa usando el método descrito anteriormente (Ejemplo 1). Se midió una actividad de 10 U por mg de proteína a 37°C.

## **Ejemplo 3**

### Crecimiento de cepas de levadura transformadas en xilosa

#### Composición del medio

[0055] Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se desarrollaron en un medio SC con la composición siguiente: 0.67% (p/v) de base nitrogenada de levadura; 0.01% (p/v) de L-triptófano; 0.01% (p/v) de Leucina L o bien de glucosa, galactosa o xilosa, o una combinación de estos sustratos (ver abajo). Para las placas de agar se suplementó el medio con un 2% (p/v) de agar bacteriológico.

#### Experimento de crecimiento

[0056] La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BJ1991 (genotipo: *mat $\alpha$* , *leu2*, *trp1*, *ura 3-251*; *prb1-1122*, *pep4-3*) transformada con pYes2 sin inserción y tres transformantes seleccionados (16.2.1, 16.2.2 y 14.3) conteniendo pYes2 con el gen *Piromyces* esp. E2 de xilosa isomerasa crecieron en placas de agar SC con 10 mM de glucosa como fuente de carbono. Cuando las colonias se hicieron visibles, se utilizaron colonias individuales para inocular el medio de SVC líquido con 100 mM de xilosa y 25 mM de galactosa como fuentes de carbono. Se controló el crecimiento midiendo el aumento en densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro LKB Ultrospec K.

### Resultados

[0057] Los resultados de los experimentos de crecimiento se compilan en la figura 1. El cultivo junto con la cepa BJ1991 transformada con pYes2 sin inserción muestra un aumento en OD600 hasta llegar a 80 h. Después de este tiempo se observa una reducción gradual. Esto es debido a la agregación de las células de levadura, lo cual se observa con frecuencia al final del crecimiento. Los cultivos con los tres transformantes no dejan de crecer después de 80 h y muestran una continuación del aumento hasta llegar al menos a 150 H.

#### **Ejemplo 4**

#### **Construcción de un vector de expresión de levadura nuevo y mejorado para la expresión constitutiva de la xilosa isomerasa de *Piromyces* esp.E2 en *Saccharomyces cerevisiae*.**

[0058] Se utilizó el vector pPICZ $\alpha$ , conteniendo el gen de *Piromyces* esp. E2 que codifica la xilosa isomerasa como molde para la PCR con ADN polimerasa Vent<sub>R</sub> (New England Biolabs). Los cebadores se diseñaron usando las secuencias 5' y 3' del gen que codifica la xilosa isomerasa e incluían un sitio EcoRI y SpeI. Además, los cebadores se diseñaron para eliminar el sitio XbaI encontrado en el constructo pPICZ $\alpha$ , sustituyéndolo por un codón de parada (TAA). El producto final se diseñó para restaurar el marco de lectura abierto original, sin los aminoácidos añadidos (marcadores his y c-Myc) encontrados en el constructo pPICZ $\alpha$ . El producto PCR se cortó con EcoRI y SpeI. El producto final se clonó en un vector derivado de pYES2 (Invitrogen). En este vector el promotor *GAL1* encontrado en pYES2 se sustituyó por el promotor TPI1 para asegurar la expresión constitutiva de la xilosa isomerasa, eliminando así la necesidad de galactosa en el medio. El promotor TPI1 se clonó de una forma modificada de plásmido pYX012 (sistemas R&D). El promotor se cortó como un fragmento de NheI-EcoRI. Tanto el promotor TPI1 como el producto de PCR del gen que codifica la xilosa isomerasa se ligaron en un corte pYES2 con SpeI y XbaI. Este plásmido se usó para transformar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-5D (donación de Peter Kötter, Frankfurt). El genotipo de la cepa es: *MatA ura3-52*. Los transformantes se seleccionaron en placas de medio mineral (Verduyn et al.: Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous- culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation.(1992) Yeast 8(7):501-17) con un 2% de glucosa como fuente de carbono. Las células no transformadas no pueden crecer en estas placas.

Los transformantes crecieron en mezclas de glucosa/xilosa en cultivos quimiostáticos con límite de carbono. Los transformantes que crecieron bajo estas condiciones mostraron altas actividades de xilosa isomerasa (800 unidades por mg a 30°C), según un ensayo enzimático específico como el llevado a cabo por Kersters-Hildersson et al. (Kinetic characterization of D-xylose isomerases by enzymatic assays using D-sorbitol dehydrogenase. Enz. Microb. Technol. 9 (1987) 145-148). La actividad in vitro de xilosa isomerasa en los extractos libres de célula de la cepa de *S. cerevisiae* transformada resultó ser dependiente de los cationes bivalentes (Mg<sup>2+</sup> o Co<sup>2+</sup>) y se midió un valor relativamente bajo de Km para la xilosa de aproximadamente 20 mM.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

[0059]

<110> Royal Nedalco B.V.

<120> Fermentación de azúcares de pentosa

<130> xilosa isomerasa de *Piromyces*

<140> BO 44829

<141> 2001-12-31

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 437

<212> PRT

<213> *Piromyces* esp.

<400> 1

ES 2 319 757 T5

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

ES 2 319 757 T5

His Met Ala Thr Met Leu Thr Met Ala Arg Asp Tyr Ala Arg Ser Lys  
 210 215 220  
 Gly Phe Lys Gly Thr Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Met Glu Pro Thr  
 225 230 235 240  
 Lys His Gln Tyr Asp Val Asp Thr Glu Thr Ala Ile Gly Phe Leu Lys  
 245 250 255  
 Ala His Asn Leu Asp Lys Asp Phe Lys Val Asn Ile Glu Val Asn His  
 260 265 270  
 Ala Thr Leu Ala Gly His Thr Phe Glu His Glu Leu Ala Cys Ala Val  
 275 280 285  
 Asp Ala Gly Met Leu Gly Ser Ile Asp Ala Asn Arg Gly Asp Tyr Gln  
 290 295 300  
 Asn Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Ile Asp Gln Tyr Glu Leu Val  
 305 310 315 320  
 Gln Ala Trp Met Glu Ile Ile Arg Gly Gly Gly Phe Val Thr Gly Gly  
 325 330 335  
 Thr Asn Phe Asp Ala Lys Thr Arg Arg Asn Ser Thr Asp Leu Glu Asp  
 340 345 350  
 Ile Ile Ile Ala His Val Ser Gly Met Asp Ala Met Ala Arg Ala Leu  
 355 360 365  
 Glu Asn Ala Ala Lys Leu Leu Gln Glu Ser Pro Tyr Thr Lys Met Lys  
 370 375 380  
 Lys Glu Arg Tyr Ala Ser Phe Asp Ser Gly Ile Gly Lys Asp Phe Glu  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Lys Leu Thr Leu Glu Gln Val Tyr Glu Tyr Gly Lys Lys Asn  
 405 410 415  
 Gly Glu Pro Lys Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Leu Tyr Glu Ala Ile  
 420 425 430  
 Val Ala Met Tyr Gln  
 435

<210> 2

<211> 1669

<212> ADN

5 <213> Piromyces esp.

<400> 2

ES 2 319 757 T5

gtaaattggct aaggaatatt tcccacaaat tcaaaagatt aagttcgaag gtaaggattc 60  
 taagaatcca ttagccttcc actactacga tgctgaaaag gaagtcattg gtaagaaaat 120  
 gaaggattgg ttacgtttcg ccatggcctg gtggcacact ctttgccgag aaggtgctga 180  
 ccaattcggg ggaggtacaa agtctttccc atggaacgaa ggtactgatg ctattgaaat 240  
 tgccaagcaa aaggttgatg ctggtttcga aatcatgcaa aagcttggtg ttccatacta 300  
 ctgtttccac gatgttgatc ttgtttccga aggtaactct attgaagaat acgaatccaa 360  
 ccttaaggct gtcggtgctt acctcaagga aaagcaaaaag gaaaccggta ttaagcttct 420  
 ctggagtact gctaacgtct tcggtcacia gcggtacatg aacgggtgct ccaactaacc 480  
 agactttgat gttgtcgcgc gtgctattgt tcaaatgaag aacgcatag acgcccgat 540

tgaacttggg gctgaaaact acgtcttctg ggggtggctg gaaggttaca tgagtctcct 600  
 taacactgac caaaagcgtg aaaaggaaca catggccact atgcttacca tggctcgtga 660  
 ctacgctcgt tccaagggat tcaagggatc tttcctcatt gaaccaaagc caatggaacc 720  
 aaccaagcac caatacgtg ttgacactga aaccgctatt ggtttcctta aggccacaa 780  
 cttagacaag gacttcaagg tcaacattga agttaaccac gctactcttg ctggtcacac 840  
 tttcgaacac gaacttgctt gtgctgttga tgctgggatg ctccggtcca ttgatgctaa 900  
 ccgtgggtgac taccaaaaacg gttgggatac tgatcaattc ccaattgatc aatacgaact 960  
 cgtccaagct tggatggaaa tcatccgtgg tgggtggttc gttactggtg gtaccaactt 1020  
 cgatgccaaag actcgtcgtg actctactga cctcgaagac atcatcattg cccacgttcc 1080  
 tggatggat gctatggctc gtgctcttga aaacgctgcc aagctcctcc aagaatctcc 1140  
 atacaccaag atgaagaagg aacgcttacc ttccttcgac agtgggtatt gtaaggactt 1200  
 tgaagatggg aagctcacc cgaacaagt ttacgaatac ggtaagaaga acggtgaacc 1260  
 aaagcaaact tctggtaagc aagaactcta cgaagctatt gttgccatgt accaataagt 1320  
 taatcgtagt taaattggta aaataattgt aaaatcaata aacttgtcaa tctccaatc 1380  
 aagtttaaaa gatcctatct ctgtactaat taaatatagt acaaaaaaaaa atgtataaac 1440  
 aaaaaaaaaag ctaaaagacg gaagaattta atttaggga aaaataaaaa taataataaa 1500  
 caatagataa atcctttata ttaggaaaat gtcccattgt attattttca tttctactaa 1560  
 aaaagaaagt aaataaaaca caagaggaaa ttttcccttt tttttttttt tgtaataaat 1620  
 tttatgcaaa tataaatata aataaaataa taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1669

<210> 3  
 <211> 494  
 <212> PRT  
 <213> *Piromyces* esp.

5

<400> 3

ES 2 319 757 T5

Met Lys Thr Val Ala Gly Ile Asp Leu Gly Thr Gln Ser Met Lys Val  
 1 5 10 15

Val Ile Tyr Asp Tyr Glu Lys Lys Glu Ile Ile Glu Ser Ala Ser Cys  
 20 25 30

Pro Met Glu Leu Ile Ser Glu Ser Asp Gly Thr Arg Glu Gln Thr Thr  
 35 40 45

Glu Trp Phe Asp Lys Gly Leu Glu Val Cys Phe Gly Lys Leu Ser Ala  
 50 55 60

Asp Asn Lys Lys Thr Ile Glu Ala Ile Gly Ile Ser Gly Gln Leu His  
 65 70 75 80

Gly Phe Val Pro Leu Asp Ala Asn Gly Lys Ala Leu Tyr Asn Ile Lys  
 85 90 95

Leu Trp Cys Asp Thr Ala Thr Val Glu Glu Cys Lys Ile Ile Thr Asp  
 100 105 110

Ala Ala Gly Gly Asp Lys Ala Val Ile Asp Ala Leu Gly Asn Leu Met  
 115 120 125

Leu Thr Gly Phe Thr Ala Pro Lys Ile Leu Trp Leu Lys Arg Asn Lys  
 130 135 140

Pro Glu Ala Phe Ala Asn Leu Lys Tyr Ile Met Leu Pro His Asp Tyr  
 145 150 155 160

Leu Asn Trp Lys Leu Thr Gly Asp Tyr Val Met Glu Tyr Gly Asp Ala  
 165 170 175

Ser Gly Thr Ala Leu Phe Asp Ser Lys Asn Arg Cys Trp Ser Lys Lys

ES 2 319 757 T5

			180					185					190			
Ile	Cys	Asp	Ile	Ile	Asp	Pro	Lys	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	
		195					200						205			
Ile	Glu	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Lys	Val	Asn	Asp	Glu	Ala	Ala	Lys	
	210					215					220					
Ala	Tyr	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Asp	
225					230					235					240	
Asn	Met	Met	Gly	Ala	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Val	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	
				245					250					255		
Thr	Met	Ser	Met	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Asp	Lys	
			260					265						270		
Pro	Ile	Ser	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Phe	Cys	Ser	Ser	Thr	
		275					280					285				
Gly	Gly	Trp	Leu	Pro	Leu	Leu	Cys	Thr	Met	Asn	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	
	290					295					300					
Glu	Phe	Val	Arg	Asn	Leu	Phe	Gln	Met	Asp	Ile	Lys	Glu	Leu	Asn	Val	
305					310					315					320	
Glu	Ala	Ala	Lys	Ser	Pro	Cys	Gly	Ser	Glu	Gly	Val	Leu	Val	Ile	Pro	
				325					330					335		
Phe	Phe	Asn	Gly	Glu	Arg	Thr	Pro	Asn	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Ala	Ser	
			340					345					350			
Ile	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Ala	Asn	Thr	Ser	Arg	Ala	Asn	Ile	Ala	Arg	
		355					360						365			
Ala	Ser	Phe	Glu	Ser	Ala	Val	Phe	Ala	Met	Arg	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala	
	370					375					380					
Phe	Arg	Lys	Leu	Gly	Phe	Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	Arg	Leu	Ile	Gly	Gly	
385					390				395						400	
Gly	Ser	Lys	Ser	Asp	Leu	Trp	Arg	Gln	Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Met	Asn	
				405					410					415		
Leu	Pro	Ile	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	
			420					425						430		
Ala	Val	Gln	Ala	Leu	Trp	Cys	Leu	Lys	Asn	Gln	Ser	Gly	Lys	Cys	Asp	
		435					440					445				
Ile	Val	Glu	Leu	Cys	Lys	Glu	His	Ile	Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	
	450					455					460					
Ala	Asn	Pro	Ile	Ala	Glu	Asn	Val	Ala	Val	Tyr	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	
465					470					475					480	
Glu	Tyr	Cys	Lys	Val	Val	Asn	Thr	Leu	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ala			
				485					490							

<210> 4  
 <211> 2041  
 <212> ADN

ES 2 319 757 T5

<213> Piromyces esp.

<400> 4

```

attatataaa ataactttaa ataaaacaat ttttatttgt ttattttaatt attcaaaaaa 60
aattaaagta aaagaaaaat aatacagtag aacaatagta ataatatcaa aatgaagact 120
gttgctggta ttgatcttgg aactcaaagt atgaaagtcg ttatttacga ctatgaaaag 180
aaagaaatta ttgaaagtgc tagctgtcca atggaattga tttccgaaag tgacgggtacc 240
cgtgaacaaa ccaactgaatg gtttgacaag ggtcttgaag tttgttttgg taagcttagt 300
gctgataaca aaaagactat tgaagctatt ggtatctctg gtcaattaca cggttttggt 360
cctcttgatg ctaacggtaa ggctttatac aacatcaaac tttgggtgga tactgctacc 420
gttgaagaat gtaagattat cactgatgct gccgggtggtg acaaggctgt tattgatgcc 480
cttggtaacc ttatgctcac cggtttcacc gctccaaaga tcctctggct caagcgcaac 540
aagccagaag ctttcgctaa cttaaagtac attatgcttc cacacgatta cttaaactgg 600
aagcttactg gtgattacgt tatggaatac ggtgatgcct ctgggtaccgc tctcttcgat 660
tctaagaacc gttgctggtc taagaagatt tgcgatatca ttgacccaaa acttttagat 720
ttacttccaa agttaattga accaagcgcct ccagctggta aggttaatga tgaagccgct 780
aagccttacg gtattccagc cggttatcca gttcccgctg gtgggtggtga taacatgatg 840
gggtgctggtg gtactggtac tgttgctgat ggtttcctta ccattgctctat ggggtacttct 900
ggtactcttt acgggttacag tgacaagcca attagtacc cagctaattgg ttttaagtgg 960
ttctgttctt ctactggtgg atggcttcca ttactttgta ctatgaactg tactgttgcc 1020
actgaattcg ttcgtaacct cttccaaatg gatattaagg aacttaatgt tgaagctgcc 1080
aagctccat gtggtagtga aggtgtttta gttattccat tcttcaatgg tgaagaact 1140
ccaaacttac caaacggtcg tgctagtatt actggtctta cttctgctaa caccagccgt 1200
gctaacattg ctcggtgctag tttcgaatcc gccgttttctg ctatgctggtg tggtttagat 1260
gctttccgta agttaggttt ccaaccaaag gaaattcgtc ttattggtgg tggttctaag 1320
tctgatctct ggagacaaat tgccgctgat atcatgaacc ttccaatcag agttccactt 1380
ttagaagaag ctgctgctct tgggtggtgct gttcaagctt tatgggtgct taagaaccaa 1440
tctggtaagt gtgatattgt tgaactttgc aaagaacaca ttaagattga tgaatctaag 1500
aatgctaacc caattgccga aaatggtgct gtttacgaca aggcttacga tgaatactgc 1560
aaggttgtaa atactctttc tccattatat gcttaaattg ccaatgtaaa aaaaaatata 1620
atgccatata attgccttgt caatacactg ttcattgttca tataatcata ggacattgaa 1680
tttacaaggt ttatacaatt aatatctatt atcatattat tatacagcat ttcattttct 1740
aagattagac gaaacaattc ttggttcctt gcaatataca aaatttacat gaatttttag 1800
aatagtctcg tattttatgcc caataatcag gaaaattacc taatgctgga ttcttggtta 1860
taaaaacaaa ataaataaat taaataaaca aataaaaatt ataagtaaat ataaatata 1920
aagtaataata aaaaaaaggt aaataaataa ataaataaat aaaaattttt tgcaaatata 1980
taataaataa aataaaatat aaaaataatt tagcaataaa attaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040
a
2041

```

5

## REIVINDICACIONES

1. Célula huésped de levadura u hongo filamentoso transformada con un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos, la cual a su vez codifica una xilosa isomerasa que comprende una  
5 secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, como se determinó usando un algoritmo de Needleman y Wunsch, la matriz de comparación BLOSUM 62, una Penalización de Espacio de 12 y una Penalización de Longitud de Espacio de 4, donde el constructo de ácidos nucleicos en la transformación de la célula huésped confiere a la célula huésped la capacidad de isomerizar xilosa a xilulosa, lo que confiere a la célula huésped la capacidad de crecer en xilosa como fuente de carbono.  
10
2. Célula huésped transformada según la reivindicación 1, donde la célula huésped es una levadura perteneciente a uno de los géneros: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* y *Yarrowia*.  
15
3. Célula huésped transformada según la reivindicación 2, donde la levadura pertenece a una de las especies: *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *K. fragilis*.
4. Célula huésped transformada según la reivindicación 1, donde la célula huésped es un hongo filamentoso perteneciente a uno de los géneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* y *Penicillium*.  
20
5. Célula huésped transformada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa se enlaza de forma operativa a un promotor que cause suficiente expresión de la xilosa isomerasa en la célula huésped para conferir a la célula huésped la capacidad para isomerizar xilosa en xilulosa.  
25
6. Célula huésped transformada según la reivindicación 5, donde el promotor es insensible a la represión catabólica en la célula huésped.
7. Célula huésped transformada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la célula huésped comprende una modificación genética que resulta en una característica seleccionada del grupo que consiste en:  
30
- (a) mayor transporte de xilosa en la célula huésped;
  - (b) mayor actividad de xilulosa quinasa;
  - (c) mayor flujo de la ruta de fosfatos de pentosa;
  - (d) menor sensibilidad a la represión catabólica;
  - (e) mayor tolerancia al etanol, osmolaridad o ácidos orgánicos; y,
  - (f) menor producción de subproductos.
8. Célula huésped transformada según la reivindicación 7, donde la modificación genética consiste en una sobreexpresión de un gen endógeno, una expresión de un gen heterólogo, o una combinación de las mismas, y donde el gen endógeno o heterólogo, se selecciona del grupo que consiste en un gen que codifica: un transportador de hexosa o pentosa, una xilulosa quinasa; una enzima de la ruta de fosfatos de pentosa, una enzima glicolítica, y una enzima etanológica.  
40
9. Célula huésped transformada según la reivindicación 7, donde la modificación genética consiste en la inactivación de un gen endógeno, donde el gen se selecciona del grupo que consiste en un gen de hexosa quinasa, los genes *Saccharomyces MIG1* y *MIG2* y homólogos híbridos de los mismos.  
45
10. Célula huésped transformada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la célula huésped expresa una o más enzimas que confieren a la célula huésped la capacidad para producir ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, aminoácidos, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, antibióticos  $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas.  
50
11. Célula huésped transformada según la reivindicación 10, donde la célula huésped contiene una modificación genética que resulta en una actividad disminuida de alcohol-deshidrogenasa.  
55
12. Proceso para producir etanol, el cual comprende las fases de:
- (a) fermentación de un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula huésped transformada tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, donde la célula huésped fermenta xilosa a etanol, y opcionalmente,
  - (b) recuperación del etanol.
- 60
13. Proceso según la reivindicación 12, donde el medio también contiene una fuente de glucosa.  
65

14. Proceso según las reivindicaciones 12 o 13, donde la productividad de etanol volumétrico es de al menos 0.5 g de etanol por litro y hora.

5 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 14, donde el rendimiento de etanol es de al menos un 50 % del rendimiento teórico de 0.51 g de etanol por g de glucosa o xilosa.

16. Proceso para producir un producto de fermentación seleccionado del grupo que consiste en ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, antibióticos  $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas, donde el proceso comprende las fases de:

10

(a) fermentación de un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula huésped transformada tal y como se define en las reivindicaciones 10 o 11, donde la célula huésped fermenta xilosa para el producto de fermentación, y opcionalmente,

(b) recuperación del producto de fermentación.

15

17. Proceso según la reivindicación 16, donde el medio también contiene una fuente de glucosa.

Fig 1

