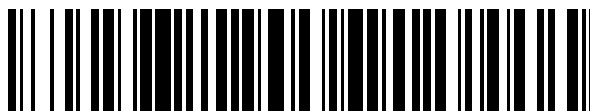


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 561**

51 Int. Cl.:  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**C12N 9/90** (2006.01)  
**C12N 9/12** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04751126 .6**  
96 Fecha de presentación: **03.05.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1626979**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.02.2006**

54 Título: **Especies de levadura genéticamente modificadas, y procesos de fermentación que emplean levaduras genéticamente modificadas**

30 Prioridad:  
**02.05.2003 US 467727 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.07.2012**

73 Titular/es:  
**Cargill, Incorporated**  
**15407 McGinty Road West**  
**Wayzata, MN 55391, US**

72 Inventor/es:  
**RAJGARHIA, Vineet;**  
**KOIVURANTA, Kari;**  
**PENTTILÄ, Merja;**  
**ILMEN, Marja;**  
**SUOMINEN, Pirkko;**  
**ARISTIDOU, Aristos;**  
**MILLER, Chris;**  
**OLSON, Stacey y**  
**RUOHONEN, Laura**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 385 561 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Especies de levadura genéticamente modificadas, y procesos de fermentación que emplean levaduras genéticamente modificadas.

5 Esta invención se realizó bajo en nº de contrato DE-FC07-021D14349 con el Departamento de Energía de EEUU. El gobierno de EEUU tiene ciertos derechos sobre esta invención.

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EEUU nº 60/467.727, presentada el 2 de mayo de 2003.

Esta invención se refiere a ciertas especies de levadura genéticamente modificadas.

10 Debido al agotamiento gradual de la materia prima del petróleo y del gas natural a nivel mundial, al deseo de parte de las naciones importadoras de petróleo de disminuir su dependencia de fuentes extranjeras de petróleo, y al deseo de establecer una base más sostenible para la economía, se están dedicando grandes esfuerzos a la producción de combustibles y de plásticos y productos químicos orgánicos procedentes de materias primas alternativas. Los procesos de fermentación ofrecen la posibilidad de producir una diversidad de combustibles y productos químicos a partir de fuentes de azúcares naturales. Por ejemplo, se produce etanol en cantidad significativa mediante la fermentación de la glucosa, de forma más típica de la glucosa obtenida hidrolizando el almidón de maíz. Una especie de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, es un biocatalizador habitual para fermentar la glucosa en etanol.

15 Estos azúcares representan una fuente de carbono relativamente cara. La biomasa, es decir, el hidrolizado de materia vegetal, ofrece la posibilidad de ser una fuente de carbono particularmente barata. La biomasa consiste principalmente en celulosa y hemicelulosa. La celulosa puede degradarse en azúcares de hexosa, generalmente glucosa. La mayoría de las levaduras, incluyendo *S. cerevisiae*, metabolizan los azúcares de hexosa con bastante eficacia. Por otra parte, la hemicelulosa es rica en azúcares de pentosa, tales como xilosa, de forma que una utilización eficaz del carbono requiere que estos azúcares de pentosa se metabolicen bien. Muy pocas levaduras metabolizan de forma eficaz la xilosa en etanol u otros productos de la fermentación deseables. Así, para aprovechar el potencial económico completo que ofrece la utilización de fuentes de carbono de biomasa es necesario proporcionar un biocatalizador que pueda convertir de modo eficaz la xilosa en productos de la fermentación deseables.

20 Diversas bacterias son capaces de metabolizar la xilosa en productos de la fermentación, pero en general producen una mezcla de productos en lugar de un único producto predominante, tal como se desea habitualmente. Los subproductos habituales a veces son tóxicos para las bacterias. Aunque ciertas bacterias se han modificado metabólicamente para que realicen fermentaciones homoetanólicas, las bacterias tienden a tener una mala actuación en el duro entorno de los hidrolizados lignocelulósicos, que son una fuente habitual de sustratos ricos en xilosa.

25 Se sabe que algunas especies de levadura, tales como *S. cerevisiae*, fermentan los azúcares de hexosa predominantemente en etanol en lugar de producir las mezclas de productos que generalmente producen las bacterias. Algunas levaduras tienen otras características que hacen que sean buenas candidatas para diversos tipos de procesos de fermentación, tales como resistencia a entornos de pH bajo, resistencia a ciertos coproductos de la fermentación, tales como ácido acético y furfural, y resistencia al propio etanol.

30 La mayoría de las especies de levadura metabolizan la xilosa (si es que pueden metabolizarla) a través de una vía compleja, en la que la xilosa en primer lugar se reduce a xilitol a través de una enzima xilosa reductasa (XR). El xilitol entonces se oxida a xilulosa a través de una enzima xilitol deshidrogenasa (XDH). La xilulosa entonces se fosforila a través de una enzima XK. Esta vía funciona de manera ineficaz en especies de levadura porque introduce un desequilibrio redox en la célula. La etapa de xilosa a xilitol emplea NADH como cofactor, mientras que la etapa de xilitol a xilulosa emplea NADPH como cofactor. Deben producirse otros procesos para restablecer el desequilibrio redox dentro de la célula. Esto a menudo significa que el organismo no puede crecer de modo anaerobio sobre la xilosa ni sobre otro azúcar de pentosa.

35 No obstante, se ha intentado introducir genes de XR y XDH exógenos en especies de levadura, tales como *S. cerevisiae*, para lograr la conversión de la xilosa en etanol. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.866.382, y los documentos WO 95/13362 y WO 97/42307. La levadura modificada no produce etanol de manera eficaz.

40 Otros organismos pueden isomerizar la xilosa en xilulosa y después fosforilar la xilulosa en xilulosa 5-fosfato, que entonces se metaboliza aún más a través de la vía del carbono central de la célula. La isomerización es estimulada por una enzima catalítica, la xilosa isomerasa (XI), y la fosforilación es catalizada por una enzima xiluloquinasa (XK). Esta vía es habitual en bacterias pero relativamente rara en especies eucariotas, tales como levaduras. No crea el desequilibrio redox de la vía de xilosa a xilitol a xilulosa, y por tanto en principio es un mecanismo anaerobio más eficaz. Se sabe que un hongo anaerobio, *Piromyces* sp. E2 (ATCC 76762), posee un gen que expresa una enzima XI activa.

55

- 5 Sin embargo, ninguna especie de levadura de tipo salvaje o recombinante tiene la capacidad de producir de modo eficaz productos de la fermentación deseables a partir de la xilosa u otras materias primas de azúcares de pentosa. Un intento de introducir el gen XI de *Piromyces* s.p. E2 en *S. cerevisiae* produjo un crecimiento muy lento sobre xilosa y no dio como resultado la producción de etanol divulgada. Véase Kuyper *et al.*, "High-Level Functional Expression of a Fungal Xylose Isomerase: The Key to Efficient Ethanolic Fermentation of Xylose by *Saccharomyces Cerevisiae*?", FEMS Yeast Research, 1574 (2003), 1-10, y el documento WO 03/062430A1.
- Por tanto, resulta muy deseable una especie de levadura que puede fermentar de modo eficaz la xilosa y otros azúcares de pentosa en un producto de la fermentación deseado.
- 10 El documento WO 03/062430 A; Lönn, A. *et al.*, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, 8 de abril de 2003, pp. 567-573; y Träff, K.L. *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, nº 12, diciembre de 2001, pp. 5668-5674, describen un *S. cerevisiae* modificado por la delección de un gen de xilosa reductasa (GRE3) y que contiene un gen de xilosa isomerasa exógeno y un gen de xiluloquinasa exógeno.
- 15 En un aspecto, la invención se refiere a una célula de levadura genéticamente modificada que tiene un genoma y un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno está unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, teniendo además la célula de levadura modificada una delección o alteración de un gen de xilosa reductasa funcional nativo que produce una enzima que cataliza la conversión de xilosa a xilitol, y teniendo además la célula una delección o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa nativo.
- 20 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una célula de levadura genéticamente modificada del género *Kluyveromyces*, que tiene integrado en su genoma un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno está unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, y teniendo además la célula una delección o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa nativo.
- 25 En otro aspecto, la invención se refiere a una célula de levadura genéticamente modificada del género *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces* o *Pachysolen* que tiene un genoma y un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno está unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, y conteniendo además un gen de xiluloquinasa exógeno funcional unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, y teniendo además la célula una delección o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa nativo.
- 30 En otro aspecto, esta invención es un proceso de fermentación en el que una célula de cualquiera de los aspectos anteriores se cultiva bajo condiciones de fermentación en un caldo de cultivo de fermentación que incluye xilosa.
- La figura 1 es un diagrama que muestra el plásmido pNC2.
- La figura 2 es un diagrama que muestra el plásmido pNC4.
- 35 La figura 3 es un diagrama que muestra el plásmido pVR22.
- La figura 4 es un diagrama que muestra el plásmido pVR29.
- La figura 5 es un diagrama que muestra los plásmidos pBH5a y pBH5b.
- La figura 6 es un diagrama que muestra el ensamblaje del plásmido pVR78 a partir de los plásmidos pVR73 y pVR77.
- 40 La figura 7 es un diagrama que muestra el plásmido pCM3.
- La figura 8 es un diagrama que muestra el plásmido pPS1.
- La figura 9 es un diagrama que muestra el plásmido pCM9.
- La figura 10 es un diagrama que muestra el plásmido pCM17.
- La figura 11 es un diagrama que muestra el plásmido pCM14.
- 45 La figura 12 es un diagrama que muestra el plásmido pCM28.
- La figura 13 es un diagrama que muestra el plásmido pVR95.
- La figuras 14a y 14b son diagramas que muestran los plásmidos pCM18 y pCM19.
- La figura 15 es un diagrama que muestra los plásmidos pBSKura3Km y pBSDeltaUra3KM.

- La figura 16 es un diagrama que muestra los plásmidos pVR52, pVR67 y pVR96.
- La figura 17 es un diagrama que muestra el plásmido pVR102.
- La figura 18 es un diagrama que muestra el plásmido pVR103.
- La figura 19 es un diagrama que muestra los plásmidos pVR65 y pVR104.
- 5 La figura 20 es un diagrama que muestra el plásmido pCM21 y pCM23.
- La figura 21 es un diagrama que muestra el plásmido pCM29.
- La figura 22 es un diagrama que muestra el plásmido pVR113.
- La figura 23 es un diagrama que muestra el plásmido pCM31.
- La figura 24 es un diagrama que muestra el plásmido pVR118.
- 10 La figura 25 es un diagrama que muestra el plásmido pCM52.
- La figura 26 es un diagrama que muestra el plásmido pCM55.
- La figura 27 es un diagrama que muestra el plásmido pCM58.
- La figura 28 es un diagrama que muestra el plásmido pMI409.
- La figura 30 es un diagrama que muestra el plásmido pMI410.
- 15 La figura 31 es un diagrama que muestra el plásmido pMI412.
- La figura 32 es un diagrama que muestra el plásmido pMI403.
- La figura 33 es un diagrama que muestra el plásmido pMI417.
- La figura 34 es un diagrama que muestra el plásmido pMI425.
- La figura 35 es un diagrama que muestra el plásmido pSO91.
- 20 La figura 36 es un diagrama que muestra el plásmido pSO99.
- La figura 37 es un diagrama que muestra el plásmido pSO89.
- La figura 38 es un diagrama que muestra el plásmido pSO96.
- La figura 39 es un diagrama que muestra el plásmido pSO57.
- La figura 40 es un diagrama que muestra el plásmido pCM48.
- 25 La levadura genéticamente modificada de la invención se fabrica realizando ciertas modificaciones genéticas en una célula de levadura hospedante.
- Una célula de levadura hospedante adecuada contiene al menos un gen nativo que produce una enzima activa que es capaz de catalizar la conversión de D-xilosa a xilitol. Estos genes pueden ser específicos para la reducción de xilosa → xilitol, o pueden ser no específicos (es decir, actúa sobre una variedad de azúcares de pentosa). Las enzimas producidas por estos genes se denominan de diversa manera con el número EC 1.1.1.21 y oficialmente alditol:NAD(P) 1-oxidoreductasa. La enzima codificada por estos genes en general tiene la siguiente actividad: D-xilosa + NAD(P)H = xilitol + NAD<sup>+</sup> (es decir, puede utilizar NADPH o NADH como cofactores redox, o ambos). Un gen que expresa la enzima xilosa reductasa se denomina en la presente un “gen de xilosa reductasa”, o un “gen XR”. En algunos casos, los genes XR específicos se denominan en la presente genes “XYL1”.
- 30 El término “nativo” se emplea en la presente con respecto a materiales genéticos (por ejemplo, un gen, un promotor, un terminador) que se encuentra dentro del genoma (aparte de las mutaciones de un individuo a otro que no afecten a su función) de las células no modificadas de esa especie de levadura.
- Una célula de levadura hospedante capaz de convertir la D-xilosa a xilitol en general tendrá la capacidad nativa para convertir también el xilitol en D-xilulosa. Esto se logra en general expresando una enzima xilitol deshidrogenasa (XDH) que es codificada por un gen denominado en la presente un “gen de xilitol deshidrogenasa” o un “gen de XDH”. Las enzimas codificadas por estos genes se denominan de diversa manera con el número EC 1.1.1.9, habitualmente xilitol deshidrogenasa, y sistemáticamente xilitol:NAD<sup>+</sup> 2-oxidoreductasa (formadora de D-xilulosa). Estos genes en general tienen la siguiente actividad: xilitol + NAD(P)<sup>+</sup> = D-xilulosa + NAD(P)H (aunque NAD<sup>+</sup> es el

5 sustrato más preferido, algunos utilizan NADP+). Los genes XDH específicos se denominan en la presente genes "XYL2". Una célula hospedante adecuada tiene uno o más genes nativos que producen una enzima aldosa reductasa o xilosa reductasa funcional, y una enzima XDH funcional. Una enzima es "funcional" en el contexto de esta invención si es capaz de desempeñar su papel habitual o previsto. Un gen es "funcional" en el contexto de la esta invención si expresa una enzima funcional.

Otra célula de levadura hospedante adecuada tiene la capacidad de transportar la xilosa a través de su pared celular o membrana.

10 Otra célula de levadura hospedante adecuada es la que crece de forma natural sobre la xilosa, tal como la que tenga una vía natural activa desde el xilulosa-5-fosfato al gliceraldehído-3-fosfato. En esta invención, se considera que la vía desde el xilulosa-5-fosfato al gliceraldehído-3-fosfato es activa si al menos 10% de los azúcares con base de glucosa son metabolizados por la célula de tipo salvaje a través de la vía de hexosa monofosfato. Preferiblemente, al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, en especial al menos 40% de la ribulosa-5-fosfato se metaboliza a través de esta vía.

15 Las células hospedantes adecuadas incluyen, por ejemplo, células de levadura de los géneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Trichosporon*, *Brettanomyces*, *Pachysolen* y *Yamadazyma*. Las especies de levadura de interés particular incluyen *K. marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *C. sonorensis*, *C. methanosorbosa*, *C. diddensiae*, *C. parapsilosis*, *C. naeodendra*, *C. balkii*, *C. entomophila*, *C. scephatae*, *P. tannophilus* y *P. stipitis*. Son ejemplos de células de levadura que crecen sobre la xilosa *K. marxianus*, *C. sonorensis*, *C. scephatae*, *Pachysolen tannophilus* y *Pichia stipitis*. Poseen una vía natural de xilulosa-5-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato, unos genes de aldosa y/o xilosa reductasa funcionales naturales, unos genes de xilitol deshidrogenasa activos, y una capacidad natural para transportar xilosa a través de la pared celular o la membrana. Las células hospedantes preferidas incluyen las de las especies *K. marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *C. sonorensis* y *C. methanosorbosa*.

25 La célula hospedante puede contener modificaciones genéticas distintas de las que se describen de modo específico en la presente. Por ejemplo, la célula hospedante puede estar genéticamente modificada para producir (o para no producir) un tipo concreto de producto de la fermentación mediante la metabolización posterior del xilosa-5-fosfato y/o gliceraldehído-3-fosfato. Los ejemplos específicos de dichas modificaciones incluyen la delección o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa (PDC) nativo, y la inserción de genes exógenos, tales como un gen de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) o D-lactato deshidrogenasa (D-LDH). Los métodos para realizar modificaciones de este tipo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 99/14335, WO 00/71738, WO 02/42471, WO 03/102201, WO 03/102152 y WO 03/049525. Estas modificaciones pueden estar presentes en la célula hospedante antes de realizar más modificaciones de la célula hospedante según se describe en la presente, o pueden realizarse al mismo tiempo o después de realizar estas más modificaciones.

35 Las células de levadura genéticamente modificadas de ciertos aspectos de la invención incluyen un gen de xilosa isomerasa (XI) exógeno funcional que preferiblemente se integra en el genoma de la célula hospedante. En este contexto, "exógeno" significa (1) que el gen XI no es nativo a la célula hospedante, (2) que el gen XI es nativo a la célula hospedante pero el genoma de la célula hospedante se ha modificado para proporcionar más copias funcionales del gen XI nativo, o (3) ambos (1) y (2). Los ejemplos de genes XI adecuados incluyen genes XI nativos a especies E2 de *Piromyces* E2 (tales como la secuencia del gen codificador de xyla de *Piromyces* sp. E2 en Genbank (nº de registro AJ249909)) y *Cyllamyces aberensis*, así como los obtenidos de otros hongos anaerobios. Las secuencias de nucleótidos para los genes XI de *Piromyces* sp. E2 y *Cyllamyces aberensis* se identifican como SEC ID NO:58 y 151, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos deducidas para las proteínas producidas por estos genes XI se identifican como SEC ID NO:59 y 152, respectivamente. Un gen XI bacteriano adecuado es nativo a *Bacteroides thetaiotaomicron*. La secuencia de nucleótidos para este gen XI de *B. thetaiotaomicron* se identifica como SEC ID NO:162. La secuencia de aminoácidos deducida para la enzima producida por este gen se identifica como SEC ID NO:163. Los genes XI adecuados incluyen los que son al menos 60%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% homólogos con SEC ID NO:58 o 151. Los genes XI adecuados incluyen los que codifican enzimas que son al menos 60%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% homólogas con SEC ID NO:59 o 152. Algunos genes de xilosa isomerasa adecuados no son más que 95% o no más que 90% homólogos con SEC ID NO:58, o codifican una enzima que no es más que 95% o no más que 90% homóloga con SEC ID NO:59. Otros genes de xilosa isomerasa adecuados son los genes de xilosa isomerasa bacterianos que son al menos 60%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% homólogos con SEC ID NO:162 y/o producen una enzima que es al menos 60%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% homóloga con SEC ID NO:163.

55 El porcentaje de homología de las secuencias de aminoácidos puede calcularse de modo conveniente utilizando el programa informático BLAST versión 2.2.1 con los parámetros por defecto. Las secuencias que tienen una puntuación de coincidencias y una puntuación de positivos de al menos XX%, utilizando el algoritmo BLAST versión 2.2.1 con los parámetros por defecto, se consideran al menos XX% homólogas. Los genes de xilosa isomerasa particularmente adecuados incluyen los que codifican una enzima que tiene una puntuación de coincidencias de al menos 60% comparada con SEC ID NO:163, una puntuación de coincidencias menor que 95% comparada con SEC ID NO:59, y una puntuación de positivos menor que 97% comparada con SEC ID NO:59.

5 El gen XI exógeno está bajo el control de un promotor y un terminador, siendo ambos funcionales en la célula de levadura modificada. Tal como se emplea en la presente, el término “promotor” se refiere a una secuencia no transcrita ubicada cadena arriba (es decir, 5') al codón de inicio de la traducción de un gen estructural (en general en aproximadamente 1 a 1000 pb, preferiblemente 1-500 pb, en especial 1-100 pb) y que controla el inicio de la transcripción del gen estructural. De manera similar, el término “terminador” se refiere a una secuencia no transcrita ubicada cadena abajo (es decir, 3') al codón de fin de la traducción de un gen estructural (en general en aproximadamente 1 a 1000 pb, de forma más típica 1-500 pares de bases, y en especial 1-100 pares de bases) y que controla el fin de la transcripción del gen estructural. Un promotor o terminador está “unido operablemente” a un gen estructural si su posición en el genoma con relación a la del gen estructural es tal que el promotor o el terminador, cualquiera que sea el caso, realiza su función de control de la transcripción.

15 Las secuencias promotoras y terminadoras pueden ser nativas a la célula de levadura o exógenas. También son útiles secuencias promotoras y terminadoras que son muy homólogas (es decir, 90% o más, en especial 95% o más, lo más preferiblemente 99% o más homólogas) en sus porciones funcionales con porciones funcionales de secuencias promotoras y terminadoras, respectivamente, que son nativas a la célula, en particular cuando la inserción del gen exógeno se dirige a un sitio específico en el genoma de la célula.

20 Un promotor adecuado es al menos 90%, 95% o 99% homólogo con un promotor que es nativo a un gen de levadura. Un promotor más adecuado es al menos 90%, 95% o 99% homólogo con un promotor para un gen que es nativo de la célula hospedante. Los promotores particularmente útiles incluyen promotores para los genes de la piruvato descarboxilasa (PDC), fosfoglicerato quinasa (PGK), xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH) y factor potenciador de la transcripción-1 (TEF-1) de levaduras, en especial de los genes que son nativos a la célula hospedante.

25 Un terminador adecuado es al menos 90%, 95% o 99% homólogo con un terminador que es nativo a un gen de levadura. El terminador puede ser es al menos 90%, 95% o 99% homólogo con un terminador para un gen que es nativo de la célula hospedante. Los terminadores particularmente útiles incluyen terminadores para los genes de la piruvato descarboxilasa (PDC), xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH) o iso-2-citocromo c (CYC) de levaduras, o un terminador de la familia de genes de la galactosa en levaduras, en particular el denominado terminador *GAL10*. Se ha demostrado que un terminador *GAL10* de *S. cerevisiae* y un terminador *CYC1* de *S. cerevisiae* son terminadores eficaces para genes XI exógenos en levaduras.

30 El uso de promotores y terminadores nativos (a la célula hospedante), junto con las respectivas regiones flanqueantes cadena arriba y cadena abajo, puede permitir la integración dirigida del gen XI en loci específicos del genoma de la célula hospedante, y la integración simultánea del gen XI y la delección de otro gen nativo tal como, por ejemplo, un gen XR, XDH o PDC.

35 Puede estar presente una cola de poli-his(tidina) en el extremo 3' del gen XI. En el siguiente ejemplo 3 se describe un método para ello. Sin embargo, la presencia de la cola de poli-his puede disminuir la actuación del gen XI. La cola de poli-his no es crítica para la invención y puede omitirse si se desea.

40 El gen XI exógeno puede integrarse aleatoriamente en el genoma de la célula hospedante o insertarse en una o más ubicaciones dirigidas. Los ejemplos de ubicaciones dirigidas incluyen los loci de un gen que está delecionado o alterado de forma deseable, tal como un gen XR, XDH o PDC. En algunas realizaciones, la integración del gen XI adyacente al sitio de un gen PDC nativo parece estar relacionada con una mejor actuación de la célula de levadura modificada para producir productos de la fermentación. La integración en el locus PDC puede realizarse con o sin delección o alteración del gen PDC nativo, pero se prefiere mantener al gen PDC nativo intacto y funcional, en particular cuando un producto de la fermentación deseado es etanol u otro producto que sea un metabolito de piruvato.

45 La integración dirigida puede lograrse diseñando un vector que tenga regiones que sean homólogas con los flancos cadena arriba (5') y cadena abajo (3') del gen diana. Cualquiera de estas regiones puede incluir una porción de la región codificadora del gen diana. El módulo de XI (que incluye promotores y terminadores asociados si son diferentes de los del gen diana) y los marcadores de selección (con promotores y terminadores asociados si son necesarios) residirán en el vector entre las regiones que son homólogas con los flancos cadena arriba y cadena abajo del gen diana.

50 La célula de levadura genéticamente modificada puede contener una única copia o múltiples copias del gen XI exógeno. Si están presentes múltiples copias del gen XI exógeno, pueden estar presentes de 2 a 10 o más copias, tales como de aproximadamente 2-8 o de aproximadamente 2-5 copias. Pueden integrarse múltiples copias del gen XI exógeno en un único locus (y así son adyacentes entre sí), o en varios loci dentro del genoma de la célula hospedante. En una realización de particular interés se incorporan múltiples copias del gen XI exógeno en el locus, o adyacentes a este, de un gen PDC nativo, con o sin la delección o alteración del gen PDC nativo. Es posible que diferentes genes XI exógenos estén bajo el control de diferentes tipos de promotores y/o terminadores.

55 La actuación de la levadura modificada, en especial bajo condiciones anaerobias, mejora realizando una o más modificaciones adicionales en su genoma y/o seleccionando células hospedantes que tengan ciertas características.

Estas incluyen una o más de (1) baja actividad XR (u otra aldosa reductasa), (2) baja actividad XDH, y (3) sobreexpresión de XK.

La célula hospedante pueden tener de forma natural o haber sido modificada para que tenga una baja actividad aldosa reductasa. Esta baja actividad aldosa reductasa, medida de una manera descrita en el siguiente ejemplo 4E, de forma adecuada es menor que 10 mU/mg o menor que 5 mU/mg. Si la célula hospedante contiene uno o más genes de aldosa reductasa que producen enzimas que catalizan la conversión de xilosa a xilitol, de manera adecuada uno o más de estos genes se altera o delecta. En general, el gen o genes seleccionados para la alteración o delectación son aquellos que son responsables, individual o colectivamente, de (1) al menos 40%, preferiblemente al menos 50% de la actividad de reducción de xilosa → xilitol de la célula hospedante, y/o (2) son genes XR, es decir, genes que codifican una enzima específica de la reducción de xilosa → xilitol. En general se prefiere delectar o alterar al menos un gen XR. La delectación o la alteración preferiblemente logra al menos una reducción del 50% en la actividad enzimática, y más preferiblemente reduce la actividad xilosa reductasa hasta menos de 10 mU/mg o 5 mU/mg.

“Delectar o alterar” significa que la región codificadora completa del gen se elimina (delectación), o el gen o su región promotora y/o terminadora se modifica (tal como mediante delectación, inserción o mutación) de modo que el gen ya no produce una enzima activa o produce una enzima con una actividad muy reducida. La delectación o alteración puede realizarse por métodos de ingeniería genética, evolución forzada o mutagénesis y/o selección. En el caso del gen XR o de aldosa reductasa no específico, un método adecuado para ello es clonar las regiones flanqueantes cadena arriba y cadena abajo del gen (que puede incluir una porción de la región codificadora del gen), producir un vector que contenga los flancos clonados cadena arriba y cadena abajo, y transformar la célula hospedante con el vector. El vector puede contener otro material genético, tal como un gen marcador u otro gen que se inserte de modo deseable en el genoma de la célula hospedante en el locus del gen XR nativo o de aldosa no específico (tal como un gen XI, un gen XK, o un gen que permita a la célula producir un producto de la fermentación deseado, tal como un gen L- o D-LDH).

Un método para delectar el gen XR o de aldosa reductasa no específico es transformar la célula hospedante con un vector que contenga regiones que sean homólogas con los flancos cadena arriba (5') y cadena abajo (3') del gen diana. Estas secuencias flanqueantes pueden obtenerse, por ejemplo, amplificando las regiones apropiadas mediante PCR utilizando cebadores diseñados de forma apropiada y ADN genómico como molde. Cualquiera de estas dos regiones puede incluir una porción de la región codificadora del gen diana, aunque el vector no debe contener la porción funcional completa del gen. Estas secuencias flanqueantes son en general secuencias de al menos 50 pares de bases, o al menos 100 o al menos 500 pares de bases. Aunque en teoría no hay un límite superior para la longitud de la secuencia flanqueante, tiene una longitud de preferiblemente hasta aproximadamente 4000 pares de bases, más preferiblemente hasta aproximadamente 1200 pares de bases. Las secuencias flanqueantes son cada una al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% y aún más preferiblemente al menos 99% homólogas con las correspondientes secuencias en el genoma de la célula. Estas secuencias flanqueantes pueden incluir las secuencias promotoras y terminadoras, respectivamente, del gen diana. El vector también puede contener uno o más módulos de marcadores de selección (con los promotores y terminadores asociados que sean necesarios) que están emplazados, de forma ventajosa, entre las regiones que son homólogas a los flancos cadena arriba y cadena abajo del gen diana. Este vector puede delectar el gen diana en una recombinación homóloga, insertando el gen marcador de la selección en el locus del gen diana delectado. El vector puede incluir, en lugar del módulo del marcador de selección o además de este, otro módulo de expresión, tal como un módulo de expresión de XI, y un módulo de L- o D-LDH, o un módulo de expresión de xiluloquinasa, todos los cuales pueden incluir promotores y terminadores asociados. También pueden diseñarse vectores que aprovechen acontecimientos de formación de bucles espontáneos, tales como los que se describen en el documento WO 03/102152.

La célula hospedante puede tener de modo natural o puede haberse modificado para que tenga una baja actividad xilitol deshidrogenasa. Esta baja actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa, medida de la manera descrita en el siguiente ejemplo 6B, de forma adecuada es menor que 2 mU/mg o menor que 1 mU/mg. Si la célula hospedante contiene uno o más genes de xilitol deshidrogenasa que produzca unas actividades mayores de xilitol deshidrogenasa, uno o más de estos genes se altera o delecta de modo adecuado. La delectación o alteración del gen XDH puede realizarse de una manera análoga a la descrita anteriormente con respecto a la delectación o alteración de la aldosa reductasa. La delectación puede realizarse incorporando los flancos cadena arriba y cadena abajo del gen XDH en un vector de transformación, en lugar de los flancos del gen XR o de aldosa reductasa no específico. Al igual que anteriormente, el vector puede incluir uno o más módulos de marcadores de selección y/o uno o más módulos de expresión distintos. La delectación o alteración preferiblemente logra una reducción de al menos 50% en la actividad enzimática, y más preferiblemente reduce la actividad xilitol deshidrogenasa hasta menos de 2 mU/mg o 1 mU/mg.

La célula modificada preferiblemente expresa una enzima xiluloquinasa que tiene una actividad de al menos 100 mU/mg, tal como al menos 300 mU/mg o al menos 500 mU/mg, medida como se describe en el siguiente ejemplo 5E. La enzima xiluloquinasa se denomina de diversa manera con el número EC 2.7.1.17 y sistemáticamente como ATP:D-xilulosa 5-fosfotransferasa. Su actividad en general es  $ATP + D\text{-xilulosa} = ADP + D\text{-xilulosa 5-fosfato}$

xiluloquinasa (XK). Puede lograrse la sobreexpresión, por ejemplo, por evolución forzada (bajo condiciones que favorezcan la selección de mutantes que sobreexpresen la enzima), mutagénesis, o mediante la integración de uno o más genes de xiluloquinasa endógenos funcionales en el genoma de la célula hospedante. En este contexto, "exógeno" significa (1) que el gen XK no es nativo a la célula hospedante, (2) que el gen XK es nativo a la célula hospedante pero el genoma de la célula hospedante se ha modificado para proporcionar más copias funcionales del gen XK nativo, o (3) ambos (1) y (2). Los genes de xiluloquinasa adecuados incluyen genes de xiluloquinasa de levadura. Un ejemplo preferido de un gen XK adecuado es el gen XK de *S. cerevisiae* (*ScXKS1*). Una secuencia de nucleótidos para el gen *ScXKS1* se identifica como SEC ID NO:83. La secuencia de aminoácidos deducida para las enzimas producidas por el gen *ScXKS1* se identifica como SEC ID NO:84. Los genes XK adecuados incluyen los que son al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% homólogos con SEC ID NO:83. Los genes XK adecuados incluyen los que codifican enzimas que son al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% homólogas con SEC ID NO:84. Otros genes XK adecuados son nativos a *K. marxianus* o *C. sonorensis*, o son al menos 70%, 80%, 80%, 95%, 98% o 99% homólogos con cualquiera de estos.

El gen XK exógeno está bajo el control de un promotor y un terminador, siendo ambos funcionales en la célula de levadura modificada. Las secuencias promotoras y terminadoras adecuadas pueden ser nativas a la célula hospedante o mostrar una alta homología (es decir, una homología 90% o mayor, en especial 95% o mayor, lo más preferiblemente 99% o mayor) con un promotor o terminador nativo. Estos promotores o terminadores son particularmente útiles cuando el gen XK endógeno se dirige a un sitio específico en el genoma de la célula hospedante. Otros promotores y terminadores adecuados son nativos al organismo del cual se obtiene el gen XK, o muestran una alta homología similar con dichos promotores y/o terminadores nativos. Por ejemplo, los promotores y terminadores adecuados para el gen *ScXKS1* identificados anteriormente incluyen promotores y terminadores para genes de *S. cerevisiae*. Los promotores y/o terminadores pueden ser nativos al gen XK particular, o pueden mostrar una alta homología similar con dichos promotores y/o terminadores.

Los promotores particularmente útiles para el gen *ScXKS1* incluyen los promotores de la piruvato descarboxilasa (PDC), fosfoglicerato quinasa (PGK), xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH), y factor potenciador de la transcripción-1 (TEF-1) de *S. cerevisiae*. Los terminadores particularmente útiles para el gen *ScXKS1* incluyen los terminadores de la piruvato descarboxilasa (PDC), xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH) o iso-2-citocromo c (CYC) de *S. cerevisiae*, o un terminador de la familia de genes de la galactosa en levaduras, en particular el denominado terminador *GAL10*. Se ha demostrado que un terminador *GAL10* de *S. cerevisiae* y un terminador *CYC1* de *S. cerevisiae* son terminadores eficaces para genes XI exógenos en levaduras.

El gen XK exógeno puede integrarse aleatoriamente en el genoma de la célula hospedante o insertarse en una o más ubicaciones dirigidas, utilizando métodos análogos a los que se emplean para insertar el gen XR, tal como se analizó anteriormente. Los ejemplos de ubicaciones dirigidas incluyen los loci de un gen que se deleciona o altera de forma deseable, tal como un gen XR, XDH o PDC. Igual que antes, la integración dirigida puede lograrse diseñando un vector que tenga regiones que sean homólogas con los flancos cadena arriba (5') y cadena abajo (3') del gen diana. Cualquiera de estas dos regiones puede incluir una porción de la región codificadora del gen diana. El módulo de XR (incluyendo promotores y terminadores asociados si son diferentes de los del gen diana) y los marcadores de selección (con promotores y terminadores asociados si son necesarios) residirán en el vector entre las regiones que son homólogas con los flancos cadena arriba y cadena abajo del gen diana.

La célula de levadura genéticamente modificada puede contener una única copia o múltiples copias (tal como de 2 a 10 o más copias, de 2 a 8, o de 2 a 5 copias) del gen XK exógeno. Pueden integrarse múltiples copias del gen XK exógeno en un único locus (y así seran adyacentes entre sí), o en varios loci dentro del genoma de la célula hospedante. Es posible que diferentes genes XK exógenos estén bajo el control de diferentes tipos de promotores y/o terminadores.

Las células según la invención que tienen baja actividad xilulosa reductasa, baja actividad xilitol deshidrogenasa, y una actividad xiluloquinasa sobreexpresada son excelentes hospedantes para la selección de genes de xilosa isomerasa exógenos para su actividad en la célula hospedante. Estas modificaciones genéticas crean un entorno celular que tiende a favorecer la expresión de xilosa isomerasa, de modo que si cierto gen de hecho es activo, es menos probable que su actividad sea reprimida por el entorno celular y, por tanto, será mensurable en la célula.

La modificación genética de la célula hospedante se logra en una o más etapas mediante el diseño y la construcción de vectores apropiados y la transformación de la célula hospedante con estos vectores. Pueden utilizarse métodos de transformación de electroporación y/o químicos (tales como basados en cloruro de calcio o acetato de litio). Los métodos para transformar cepas de levaduras se describen en los documentos WO 99/14335, WO 00/71738, WO 02/42471, WO 03/102201, WO 03/102152, y WO 03/049525; estos métodos son aplicables en general a la transformación de células hospedantes según esta invención. El ADN utilizado en las transformaciones puede cortarse con enzimas de restricción concretas o utilizarse como ADN circular.

Se han analizado de modo general anteriormente las estrategias generales para el diseño de vectores de transformación. A continuación se indican algunos diseños de vectores de transformación específicos, listándose los componentes en orden de lectura/transcripción. Todos pueden circularizarse o linealizarse. Todos pueden contener



sitios de restricción de diversos tipos para la linealización o la fragmentación. Los vectores también pueden contener una porción de esqueleto (tal como para la propagación en *E. coli*), que se obtiene de modo conveniente de vectores de levadura o bacterianos disponibles en el mercado.

- 5 1. Región cadena arriba (5') del gen XR de la célula hospedante; el módulo de expresión del marcador, la región cadena abajo (3') del gen XR del hospedante. El módulo de expresión del marcador puede ser un módulo de expresión de resistencia a la higromicina, Ura3 o G418, con los promotores y terminadores necesarios. Un módulo de Ura3 puede ser un módulo de *HisG-Ura3-HisG*. Un módulo de G418 puede incluir el promotor *ScPDC1* y el terminador *ScGAL10*.
  - 10 2. Igual que (1), con el módulo de XI (que incluye el promotor y el terminador unidos operablemente al gen) ubicado entre las regiones 5' y 3' del gen XR de la célula hospedante. El módulo de XI puede incluir un promotor que es nativo a la célula hospedante. El módulo de XI puede incluir un terminador *ScCYC1* o *ScGAL10*.
  - 15 3. Igual que (1) o (2), con el módulo de XK (que incluye el promotor y el terminador unidos operablemente al gen) ubicado entre las regiones 5' y 3' del gen XR de la célula hospedante. El módulo de XK puede incluir un promotor que es nativo a la célula hospedante, o un promotor *ScTEF1*. El módulo de XI puede incluir un terminador *ScCYC1* o *ScGAL10*.
  - 20 4. Región cadena arriba (5') del gen XDH de la célula hospedante; el módulo de expresión del marcador, la región cadena abajo (3') del gen XDH del hospedante. El módulo de expresión del marcador puede ser un módulo de expresión de resistencia a la higromicina, Ura3 o G418, con los promotores y terminadores necesarios. Un módulo de Ura3 puede ser un módulo de *HisG-Ura3-HisG*. Un módulo de G418 puede incluir el promotor *ScPDC1* y el terminador *ScGAL10*.
  - 25 5. Igual que (4), con el módulo de XI (que incluye el promotor y el terminador unidos operablemente al gen) ubicado entre las regiones 5' y 3' del gen XR de la célula hospedante. El módulo de XI puede incluir un promotor que es nativo a la célula hospedante. El módulo de XI puede incluir un terminador *ScCYC1* o *ScGAL10*.
  - 30 6. Igual que (4) o (5), con el módulo de XK (que incluye el promotor y el terminador unidos operablemente al gen) ubicado entre las regiones 5' y 3' del gen XR de la célula hospedante. El módulo de XK puede incluir un promotor que es nativo a la célula hospedante, o un promotor *ScTEF1*. El módulo de XI puede incluir un terminador *ScCYC1* o *ScGAL10*.
  - 35 7. El módulo *HisG-Ura3-HisG* precedido o seguido de un módulo de XI o un módulo de XK.
  - 40 8. Un módulo de XI que incluye un promotor de *K. marxianus* o un promotor de *C. sonorensis*, estando el módulo de XI precedido o seguido por un módulo de expresión del marcador. El promotor de *K. marxianus* o *C. sonorensis* puede ser un promotor de PDC o PDK. El terminador en el módulo de XI puede ser un terminador de *K. marxianus*, *C. sonorensis* o *S. cerevisiae*, y puede ser de modo específico un terminador *ScCYC1* o *ScGAL10*. El módulo de expresión del marcador puede ser un módulo de expresión de resistencia a la higromicina, Ura3 o G418, con los promotores y terminadores necesarios. Un módulo de Ura3 puede ser un módulo de *hisG-Ura3-hisG*. Un módulo de G418 puede incluir el promotor *ScPDC1* y el terminador *ScGAL10*. El módulo de XI también puede incluir un módulo de XK (tal como se describe a continuación en 9), cadena arriba o cadena abajo del módulo de XI, y cadena arriba o cadena abajo del módulo de expresión del marcador.
  - 45 9. Un módulo de XK al que precede o sigue un módulo de expresión del marcador. El módulo de XK puede incluir un promotor de *K. marxianus*, un promotor de *C. sonorensis*, o un promotor de *S. cerevisiae*. El promotor del módulo de XK puede ser de modo específico un promotor de PDC o PGK de *K. marxianus* o *C. sonorensis*, o de PDC, PGK o TEF1 de *S. cerevisiae*. El terminador en el módulo de XK puede ser un terminador de *K. marxianus*, *C. sonorensis* o *S. cerevisiae*, y puede ser de modo específico un terminador *ScCYC1* o *ScGAL10*. El módulo de expresión del marcador puede ser módulo de expresión de resistencia a la higromicina, Ura3 o G418, con los promotores y terminadores necesarios. Un módulo de Ura3 puede ser un módulo de *hisG-Ura3-hisG*. Un módulo de G418 puede incluir el promotor *ScPDC1* y el terminador *ScGAL10*.
  - 50 10. Un módulo de XI, un módulo de XK o ambos, precedidos por una región cadena arriba (5') de un gen XR de la célula hospedante; y seguido de una región cadena abajo (3') de un gen XR del hospedante. Este vector puede incluir otros componentes entre las regiones cadena arriba y cadena abajo del gen XR.
  - 55 11. Un módulo de XI, un módulo de XK o ambos, precedidos por una región cadena arriba (5') de un gen XDH de la célula hospedante; y seguido de una región cadena abajo (3') de un gen XDH del hospedante. Este vector puede incluir otros componentes entre las regiones cadena arriba y cadena abajo del gen XDH.
  12. Cualquiera de los anteriores plásmidos que incluye además un sitio de autorreplicación que es activo en la célula hospedante.
- Los módulos de XI específicos útiles en los anteriores vectores incluyen el promotor de *PDC1* (*KmPDC1*), el gen XI (según se describió anteriormente), y el terminador *ScCYC1*, *ScGAL10* o *KmPDC1* de *K. marxianus*; el promotor de

*PDC1* (*CsPDC1*), el gen XI, y el terminador *ScCYC1*, *ScGAL10* o *CsPDC1* de *C. sonorensis*; y el promotor de *PGK* (*CsPGK*), el gen XI, y el terminador *ScCYC1*, *ScGAL10* o *CsPDC1* de *C. sonorensis*.

5 Los módulos de XK específicos en los anteriores vectores incluyen el promotor de *PDC1* (*KmPDC1*), el gen XK (cualquiera de los descritos anteriormente, pero en especial el gen *ScXKS1*), y el terminador *ScCYC1*, *ScGAL10* o *KmPDC1* de *K. marxianus*; el promotor de *PDC1* (*CsPDC1*), el gen XK, y el terminador *ScCYC1*, *ScGAL10* o *CsPDC1* de *C. sonorensis*; el promotor de *PGK* (*CsPGK*), el gen XK, y el terminador *ScCYC1*, *ScGAL10* o *CsPDC1* de *C. sonorensis*; y el promotor de TEF-1 (*ScTEF1*), el gen XK, y el terminador *ScCYC1*, *ScGAL10* o *CsPDC1* de *S. cerevisiae*.

10 Además de los genes de marcadores de selección específicos descritos anteriormente, los genes de marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo zeocina (gen de resistencia a la bleomicina *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*), G418 (gen de resistencia a la kanamicina de Tn903), higromicina (gen de resistencia a antibióticos de aminoglicósidos de *E. coli*), ampicilina, tetraciclina, o kanamicina para las células hospedantes; (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula, tales como deficiencia en el aminoácido leucina (gen *Leu2* de *K. marxianus*) o deficiencia en uracilo (por ejemplo, gen *Ura3* de *K. marxianus* o *S. cerevisiae*); (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios sencillos, o (d) confieren capacidad a la célula para que crezca en una fuente de carbono concreta. Un gel de xilosa isomerasa puede actuar de esta manera, permitiendo que se produzca la selección basándose en la capacidad para crecer en xilosa.

20 Los transformantes que se han producido con éxito pueden seleccionarse de una manera conocida, aprovechando los atributos aportados por el gen marcador, o por otras características (tales como la capacidad para crecer en xilosa) aportadas por los genes insertados. La selección puede realizarse mediante análisis de PCR o de la transferencia Southern para confirmar que se han producido las inserciones y las deleciones deseadas, para confirmar el número de copias y para identificar el punto de integración de los genes en el genoma de la célula hospedante. La actividad de la enzima codificada por el gen insertado y/o la falta de actividad de la enzima codificada por el gen deleciónado puede confirmarse utilizando métodos de ensayo conocidos.

25 La célula de levadura genéticamente modificada de la invención que contiene el gen XI exógeno es útil para fermentar azúcares de pentosa para producir productos de la fermentación deseables, tales como etanol y ácido láctico. Pueden resultar necesarias ciertas modificaciones genéticas adicionales para que la célula de levadura pueda producir ciertos productos en rendimientos, titulaciones y/o productividad aceptables. Por ejemplo, puede ser necesaria la integración de un gen LDH exógeno y la deleción de genes PDC nativos para obtener altos rendimientos de ácido láctico, tal como se analizó anteriormente.

30 En el proceso de fermentación de la invención, la célula de la invención se cultiva en un medio de fermentación que incluye un azúcar de pentosa. El azúcar de pentosa es preferiblemente xilosa, xilano u otro oligómero de xilosa. Estos azúcares son, de forma adecuada, hidrolizados de una biomasa que contiene hemicelulosa. El medio de fermentación puede contener también otros azúcares, de manera notable azúcares de hexosa, tales como dextrosa (glucosa), fructosa, oligómeros de glucosa, tales como maltosa, maltotriosa e isomaltotriosa, y panosa. En el caso de los azúcares oligoméricos puede resultar necesario añadir enzimas al caldo de fermentación para digerirlos para producir el correspondiente azúcar monomérico.

35 El medio contendrá generalmente los nutrientes requeridos por la célula concreta, que incluyen una fuente de nitrógeno (tal como aminoácidos, proteínas, fuentes de nitrógeno inorgánico, tal como amoníaco o sales de amonio, y similares), y diversas vitaminas, minerales y similares.

40 No se considera que otras condiciones de fermentación, tales como la temperatura, la densidad celular, la selección del sustrato o sustratos, la selección de nutrientes y similares, sean críticas para la invención, y en general se seleccionan para proporcionar un proceso barato. Las temperaturas durante la fase de crecimiento y durante la fase de producción pueden variar desde por encima de la temperatura de congelación del medio a aproximadamente 50 °C, aunque la temperatura óptima dependerá de alguna manera del microorganismo concreto. Una temperatura preferida, en particular durante la fase de producción, es de aproximadamente 30-45 °C. Cuando la célula es una *K. marxianus* modificada puede tolerar unas temperaturas relativamente altas (tales como mayores que 40 °C y hasta 50 °C, en especial hasta 45 °C). Otra especie preferida de célula, *C. sonorensis*, puede tolerar temperaturas de hasta aproximadamente 40 °C. Este intervalo de temperatura proporciona la posibilidad de realizar la fermentación a estas temperaturas altas (reduciendo así los costes de enfriamiento) sin una pérdida significativa de productividad. Otra ventaja que proporciona una buena tolerancia a altas temperaturas es que si la fermentación resulta contaminada por un microorganismo no deseado, en muchos casos el microorganismo no deseado pueden destruirse de modo selectivo calentando el medio de fermentación hasta 40 °C o más, en especial 45 °C o más, sin dañar significativamente las células deseadas de la invención.

45 Durante la fase de producción, la concentración de células en el medio de fermentación generalmente está en el intervalo de aproximadamente 1-150, preferiblemente de aproximadamente 3-10, aún más preferiblemente de aproximadamente 3-6 g de células secas/litro de medio de fermentación.

La fermentación puede realizarse de forma aerobia, microaerobia, o anaerobia. Si se desea, la velocidad de captación de oxígeno específica puede utilizarse como control del proceso, según se describe en el documento WO 03/102200. Una ventaja de la invención es que la célula genéticamente modificada en general fermentará la xilosa de modo anaerobio debido a la expresión del gen XI y otras modificaciones.

5 Cuando el producto de la fermentación es un ácido, el medio puede tamponarse durante la fase de producción de la fermentación, de modo que se mantiene el pH en un intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0, preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0. Los agentes tamponantes adecuados son materiales básicos que neutralizan el ácido láctico a medida que se forma e incluyen, por ejemplo, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de potasio, carbonato de sodio, carbonato de amonio, amoniaco, hidróxido de amonio y similares. En general, los agentes tamponantes que se han estado utilizando en los procesos de fermentación convencionales también resultan adecuados en la presente. Sin embargo, se encuentra dentro del alcance de la invención permitir que el pH del medio de fermentación disminuya desde un pH inicial que generalmente es de 6 o mayor, hasta por debajo del pKa del producto de la fermentación ácido, tal como en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o en el intervalo de aproximadamente 2,8 a aproximadamente 4,5.

En una fermentación tamponada, los productos de la fermentación ácidos, tales como el ácido láctico, son neutralizados a medida que se forman en la correspondiente sal lactato. Por tanto, la recuperación del ácido implica la regeneración del ácido libre. Esto se realiza generalmente retirando las células y acidulando el caldo de fermentación con un ácido fuerte, tal como ácido sulfúrico. Se forma un subproducto salino (yeso en el caso en que una sal de calcio es el agente neutralizante, y el ácido sulfúrico es el agente acidulante), que se separa del ácido. Entonces se recupera el ácido mediante técnicas, tales como una extracción líquido-líquido, una destilación, una absorción, etc., como se describe en T.B. Vickroy, vol. 3, capítulo 38 de Comprehensive Biotechnology (ed. M. Moo-Young), Pergamon, Oxford, 1985; R. Datta *et al.*, FEMS Microbiol. Rev., 1995, 16:221-231; patentes de EEUU nº 4.275.234, 4.771.001, 5.132.456, 5.420.304, 5.510.526, 5.641.406, y 5.831.122, y el documento WO 93/00440.

25 El proceso de la invención puede realizarse de modo continuo, discontinuo, o en combinaciones de estos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, pero no pretenden limitar su alcance. Todas las partes y porcentajes son en peso a menos que se indique lo contrario.

**Ejemplo 1A: Construcción del plásmido que contiene el promotor de *PGK1* de *S. cerevisiae* y el terminador *Gal10* de *S. cerevisiae* (pNC2, figura 1); construcción del plásmido que contiene el promotor de *PDC1* de *S. cerevisiae* y el terminador *Gal10* de *S. cerevisiae* (pNC4, figura 2)**

La secuencia de nucleótidos del promotor de *PGK1* de *S. cerevisiae* (*ScPGK1*) se identifica como SEC ID NO:1. Esta secuencia se obtiene como un fragmento de restricción a partir de un plásmido patentado denominado pBFY004. Como alternativa, puede obtenerse mediante una amplificación con PCR utilizando el ADN cromosómico de *S. cerevisiae* como molde, y cebadores diseñados basados en SEC ID NO:1.

35 El terminador *GAL10* de *S. cerevisiae* (*ScGAL10*) utilizado tiene la secuencia de nucleótidos identificada como SEC ID NO:2. Esta secuencia se obtiene como un fragmento de restricción a partir de un plásmido patentado denominado pBFY004. Como alternativa, puede obtenerse mediante una amplificación con PCR utilizando el ADN cromosómico de *S. cerevisiae* como molde, y cebadores diseñados basados en SEC ID NO:2.

40 El promotor de *PDC1* de *S. cerevisiae* (*ScPDC1*) se amplificó con PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:3 y SEC ID NO:4, utilizando el ADN cromosómico de la cepa GY5098 de *S. cerevisiae* (ATCC 4005098) como molde. El termociclado se realizó con 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C, y 1 minuto a 72 °C, seguido de una incubación final de 7 minutos a 72 °C, utilizando la ADN polimerasa PfuTurbo (Stratagene, Madison, WI). La secuencia de nucleótidos del promotor *ScPDC1* se identifica como SEC ID NO:5.

45 Se generó el plásmido pNC2 (figura 1) combinando el promotor *ScPGK1* y el terminador *ScGal10* sobre el vector de esqueleto pGEM5Z(+) (Promega, Wisconsin). El *ScPGK1* y el *ScGAL10* están separados en el vector resultante por una región de policonector con los sitios de restricción *XbaI*, *EcoRI* y *BamHI* para insertar genes concretos para ser expresados entre el promotor y el terminador de levadura. Un fragmento de restricción *NotI* de aproximadamente 1,2 kpb formado por el promotor *ScPGK1* y el terminador *ScGAL10* con sitios de multiclonación se identifica como SEC ID NO:6.

50 Se construyó el vector de expresión pNC4 que contiene un módulo de expresión en general de la misma manera, excepto que se utilizó el gen *ScPDC1* en lugar del gen *ScPGK1*. El vector resultante (pNC4) se muestra en la figura 2. Un fragmento de restricción *NotI* de aproximadamente 1,3 kpb formado por el promotor *ScPDC1* y el terminador *ScGAL10* con sitios de multiclonación se identifica como SEC ID NO:7.

**Ejemplo 1B: Inserción de un gen marcador de resistencia a G418 en pNC2 (ejemplo 1A, figura 1) para crear un plásmido en el que el gen G418 está unido operablemente con el promotor de *PGK1* y el terminador *ScGAL10* de *S. cerevisiae* (pVR22, figura 3)**

El gen de resistencia a G418 se amplificó mediante PCR utilizando la polimerasa *Pfu* (Stratagene, Madison, WI) con los cebadores identificados como SEC ID NO:8 y SEC ID NO:9, utilizando el plásmido pPIC9K (Invitrogen, CA) como molde. El termociclado se realizó inicialmente incubando la mezcla de reacción durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 49 °C, y 2 minutos a 72 °C, seguido de una incubación final durante 10 minutos a 72 °C. El producto de la PCR se digirió con *Bam*HI y *Xba*I, y se aisló un fragmento de 821 pb y se acopló a un fragmento *Bam*HI-*Xba*I de aproximadamente 4303 pb de pNC2 (ejemplo 1A, figura 1). El plásmido resultante (pVR22, figura 3) tiene el promotor *ScPGK1* y el terminador *ScGAL10* unidos operablemente al gen de resistencia a G418.

**Ejemplo 1C: Inserción de un gen marcador de resistencia a G418 en pNC4 (ejemplo 1A, figura 2) para crear un plásmido en el que el gen G418 está unido operablemente al promotor de *PDC1* y al terminador *ScGAL10* de *S. cerevisiae* (pVR29, figura 4)**

El gen de resistencia a G418 se amplificó mediante PCR utilizando la polimerasa *Pfu* (Stratagene, Madison, WI) con los cebadores identificados como SEC ID NO:8 y SEC ID NO:9, utilizando el plásmido pVR22 (ejemplo 1B, figura 3) como molde. El termociclado se realizó inicialmente incubando la mezcla de reacción durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 49 °C, y 2 minutos a 72 °C, seguido de una incubación final durante 10 minutos a 72 °C. El producto de la PCR se digirió con *Bam*HI y *Xba*I, y se aisló un fragmento de 821 pb y se acopló a un fragmento *Bam*HI-*Xba*I de aproximadamente 4303 pb de pNC4 (ejemplo 1A, figura 2). El plásmido resultante, pVR29 (figura 4) contiene el promotor *ScPDC1* y el terminador *ScGAL10* unidos operablemente al gen de resistencia a G418.

**Ejemplo 1D: Construcción de un vector (pBH5b, figura 5) que contiene las secuencias flanqueantes 5' y 3' del gen *PDC1* de *K. marxianus*, y el gen G418 bajo el control del promotor *ScPDC1* y el terminador *ScGAL10***

Un fragmento de ADN de 1254 pb inmediatamente cadena arriba del gen *PDC1* de *K. marxianus* (*KmPDC1*) se amplificó mediante PCR con los cebadores identificados como SEC ID NO:10 y SEC ID NO:11, utilizando el plásmido pSO21 (descrito en la solicitud de patente publicada de EEUU 2004/029256A1) como molde. El termociclado se realizó incubando inicialmente la mezcla de reacción durante 2 minutos a 94 °C, después con 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, y 1,5 minutos a 72 °C, seguido de una incubación final de 7 minutos a 72 °C. El producto de la PCR se separó en un gel de agarosa al 0,8% y se aisló un producto de aproximadamente 1254 pb. El producto de la PCR y el plásmido pVR29 (ejemplo 1C, figura 4) se digirieron ambos con *Kpn*I y *Sbf*I, y se acoplaron para producir un vector de aproximadamente 6315 pb denominado pBH5a (figura 5). El plásmido pBH5a contiene el gen de resistencia a G418 unido operablemente al promotor *ScPDC1* y al terminador *ScGAL10*, y un fragmento de ADN de aproximadamente 1240 pb homólogo al ADN inmediatamente cadena arriba del gen *KmPDC1*.

Un fragmento de ADN de 535 pb inmediatamente cadena abajo del gen *KmPDC1* se amplificó mediante PCR con los cebadores identificados como SEC ID NO:12 y SEC ID NO:13, utilizando el plásmido pSO21 como molde. El termociclado se realizó incubando inicialmente la mezcla de reacción durante 2 minutos a 94 °C, después con 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, y 45 segundos a 72 °C, seguido de una incubación final de 4 minutos a 72 °C. El producto de la PCR se separó en un gel de agarosa al 0,8% y se aisló un producto de 535 pb. El producto de la PCR se digirió con *Sbf*I y *Mlu*I, y el fragmento de 529 resultante se acopló con el fragmento *Sbf*I-*Mlu*I de pBH5a para producir el plásmido pBH5b (figura 5). El plásmido pBH5b contiene secuencias correspondientes a las que flanquean el gen *KmPDC1*, es decir, una secuencia flanqueante cadena arriba de aproximadamente 1,2 kpb y una secuencia flanqueante cadena abajo de ADN de aproximadamente 0,5 kpb, con un único sitio *Sbf*I ubicado entre ellas. El plásmido pBH5b también contiene el marcador de resistencia a G418 unido operablemente al promotor *ScPDC1* y al terminador *ScGAL10*.

**Ejemplo 1E: Construcción del vector que contiene un marcador de poli-his y el terminador *CYC1* de *S. cerevisiae* (pVR73, figura 6); eliminación del gen marcador de la resistencia a G418 de pBH5b (ejemplo 1D, figura 5) para formar el vector pVR77 (figura 6)**

Se diseñaron los cebadores identificados como SEC ID NO:14 y SEC ID NO:15 basados en el vector pYES6CT (Invitrogen, CA) para la amplificación de bases que contienen un sitio de clonación múltiple, un marcador de poli-his, y un terminador *CYC1* de *S. cerevisiae* (*ScCYC1*). Los cebadores introducen sitios *Sbf*I y *Bsm*BI en el producto. Las condiciones de la PCR fueron 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, y 1 minuto a 68 °C, seguido de una incubación final a 68 °C durante 10 minutos utilizando la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen, CA). El producto de la PCR se purificó en columna, seguido de la adición de nucleótidos de adenina a los extremos 5' de la clonación TA utilizando la ADN polimerasa Taq incubándose a 72 °C durante 10 minutos. El producto de 507 pb entonces se clonó con TA en un vector de clonación de TA TOPOII (Invitrogen, CA), y se denominó pVR73 (figura 6). La inclusión del marcador de poli-his en este vector provoca que los genes clonados en el sitio *Sbf*I exclusivo tengan el marcador de his condensado a la proteína expresada a partir de ese gen. Este marcaje de la proteína con el marcador de poli-his permite una detección mediante transferencia Western relativamente rápida de la proteína utilizando el conjugado Ni-NTA (HRP) (Quiagen, EEUU) y para la purificación rápida del gen expresado utilizando columnas y resina quelante de Ni (Invitrogen, CA).

El plásmido pBH5b (ejemplo 1D, figura 5) se digirió con *SphI*, y un fragmento de aproximadamente 4,7 kpb que mantiene el promotor *KmPDC1* y el terminador se volvió a acoplar consigo mismo para producir el plásmido pVR77 (figura 6). Así se elimina el marcador de selección del antibiótico G418 de pBH5b.

**Ejemplo 1F: Construcción de un vector pVR78 (figura 6) que contiene la región flanqueante cadena arriba *KmPDC1*, un sitio de multiclonación, un marcador de poli-his, y el terminador *ScCYC1***

El plásmido pVR73 (ejemplo 1E, figura 6) se digirió con las enzimas *SbfI* y *BsmBI* para liberar un fragmento de 504 pb que contiene un sitio de multiclonación, un marcador de poli-his, y un terminador *ScCYC1*. El vector pVR77 se digirió utilizando las mismas enzimas para producir un fragmento de aproximadamente 4249 pb que contenía el esqueleto del vector y los flancos cadena arriba y cadena abajo de *KmPDC1*. Los dos fragmentos se acoplan para formar un plásmido de aproximadamente 4752 pb (pVR78, figura 6) que contiene el sitio de restricción *SbfI* exclusivo 184 pb desde el marcador de poli-his. Este proceso elimina la mayor parte de la región flanqueante cadena abajo de *KmPDC1* del plásmido pVR78.

**Ejemplo 1G: Modificación del plásmido pVR78 (ejemplo 1F, figura 6) para formar el plásmido pCM3 (figura 7) con una distancia reducida desde el sitio de restricción *SbfI* al marcador de poli-his para una mejor expresión génica**

Los cebadores identificados como SEC ID NO:16 y SEC ID NO:17 se diseñaron para amplificar la región completa del plásmido pVR78 del marcador de poli-his hasta el terminador *ScCYC1*. Los cebadores también tenían un sitio *SbfI* 5' inmediatamente cadena arriba del marcador de poli-his y 3' del sitio *SapI*. La reacción de PCR se realizó utilizando métodos convencionales. Las condiciones de PCR consistieron en una incubación inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 63 °C, y 1 minuto a 68 °C. A esto le siguieron 20 ciclos más de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 68 °C. La etapa final fue una incubación de 8 minutos a 68 °C. La amplificación se realizó utilizando la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen, CA). El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción *SbfI* y *SapI*. Un fragmento de aproximadamente 3,9 kb obtenido mediante la digestión del plásmido pVR78 con las enzimas 5' *SbfI* y 3' *SapI* se acopló con el producto de la PCR. Este plásmido resultante se denominó pCM3 (figura 7).

**Ejemplo 1H: Construcción de un plásmido (pPS1, figura 8) que contiene el gen de resistencia a la higromicina de *E. coli* bajo el control transcripcional del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10***

El gen *hph* de *E. coli* que confiere resistencia a la higromicina B se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:18 y SEC ID NO:19, utilizando el plásmido pRLMex30 (Mach *et al.*, 1994, *Curr. Genet.*, 25, 567-570) como molde. El gen *hgh* también puede obtenerse utilizando los mismos cebadores con ADN cromosómico de *E. coli* como molde. El termociclado se realizó con 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C, y 3 minutos a 72 °C, seguido de una incubación final de 7 minutos a 72 °C utilizando la ADN polimerasa PfuTurbo (Stratagene, Madison, WI). El producto de la PCR se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 0,8% y se aisló un fragmento de 1026 pb. El fragmento de 1026 pb entonces se digirió con *XbaI* y *BamHI* y se acopló en el fragmento *XbaI-BamHI* de pNC4 (ejemplo 1A, figura 2) que contenía el promotor *ScPDC1* y el terminador *ScGAL10* para producir el plásmido pPS1 (figura 8).

**Ejemplo 1I: Construcción de un vector (pCM9, figura 9) que contenía la región flanqueante cadena arriba de *KmPDC1*, un sitio de multiclonación, un marcador de poli-his, un terminador *ScCYC1* (todos de pCM3, ejemplo 1G, figura 7) y el gen de resistencia a la higromicina de *E. coli* bajo el control transcripcional del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10* (de pSI1, ejemplo 1H, figura 8)**

El plásmido pPS1 se digirió con *SphI*, y un fragmento de aproximadamente 2,2 kpb que contenía el gen *hgh* bajo el control del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10* se acopló a pCM3 digerido con *SphI*. El plásmido resultante (pCM9, figura 9) contiene la región promotora *KmPDC1*, seguida de un único sitio *SbfI* y del terminador *ScCYC1* para la futura expresión del gen de la xilosa isomerasa. Además, este módulo para la expresión génica está colocado justo al lado de un fragmento de aproximadamente 2,2 kpb que contiene el gen *hph* bajo el control del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10* para la selección de los transformantes en levaduras.

**Ejemplo 2A: Reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces* sp. E2 (PXYLA) basada en la secuencia disponible en GenBank**

El método utilizado para reconstruir el gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces* sp. E2 (PXYLA) se adapta de "A method for synthesizing genes and cDNA's by polymerase chain reaction", de Alberto Di Donato *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 212, 291-293 (1993). Los cebadores purificados mediante PAGE se ordenan comenzando desde el centro del gen para ir reconstruyendo hacia afuera. Se mantienen los solapamientos de 14-16 pb para los conjuntos de cebadores. Cada cebador tiene una longitud de 60-70 pb. El gen se reconstruyó en 17 etapas.

El protocolo de PCR que se siguió durante este método emplea la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen, CA), y su tampón y MgSO<sub>4</sub> según indica el fabricante. La etapa 1 se realiza utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:20 y SEC ID NO:21. Estos cebadores representan el centro de la secuencia génica. No se necesita

molde en la etapa 1, puesto que el apareamiento de los cebadores y su extensión formará el molde central sobre el cual se construirán las posteriores reacciones de PCR. El ciclado en la etapa 1 es de 20 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 54 °C durante 1 minuto, y 68 °C durante 2 minutos (añadiéndose 5 segundos más a cada ciclo sucesivo), seguido de una conservación a 4 °C.

- 5 En las etapas de reacción 2-17, se utilizó la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen, CA), y su tampón y MgSO<sub>4</sub> según indica el fabricante. Se emplearon 2,5 µl de la mezcla de cada etapa como molde para cada etapa posterior (reacción de 50 µl). Los conjuntos de cebadores para cada reacción se describen en la tabla 1. El molde en cada caso fue de 5 µl de ADN de la etapa de reacción anterior. El ciclado en las etapas 2-17 fue de 20 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 46 °C durante 1 minuto, y 68 °C durante 2 minutos (añadiéndose 5 segundos más a cada ciclo sucesivo), seguido de una conservación a 4 °C.
- 10

Tabla 1

Etapa de reacción nº	SEC ID NO:
1	20, 21
2	22, 23
3	24, 25
4	26, 27
5	28, 29
6	30, 31
7	32, 33
8	34, 35
9	36, 37
10	38, 39
11	40, 41
12	42, 43
13	44, 45
14	46, 47
15	48, 49
16	50, 51
17	52, 53

- 15 **Ejemplo 2B: Construcción del vector pCM17 (figura 10) que contiene el gen *PXYLA* reconstruido; mutagénesis dirigida específica de sitio para alterar las bases sobre el gen reconstruido para que coincida con la secuencia en la base de datos de GenBank**

Se construyó un plásmido que contenía el gen *PXYLA* reconstruido (ejemplo 2A) acoplado un fragmento de aproximadamente 1,314 kpb producido en la ronda final de la construcción, con un vector TOPOII (Invitrogen, CA). El gen *PXYLA* reconstruido se diferenció de la secuencia de GenBank en cinco bases. Cada una de estas diferencias se corrigió utilizando un kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios (Stratagene, CA), utilizando este plásmido como molde. Se emplearon tres cebadores mutagénicos 5'-fosforilados purificados por PAGE o HPLC, identificados como SEC ID NO:54, SEC ID NO:55 y SEC ID NO:56 para corregir cuatro de los errores. Los parámetros de ciclado térmico incluyen una etapa de desnaturalización de un minuto y una etapa de apareamiento de un minuto, seguido de una extensión de ocho minutos. Entonces se digirió la hebra parental formada durante la etapa de PCR añadiendo 1 µl de la enzima *DpnI* a la mezcla al final del termociclado. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C y después se utilizó para transformar células de *E. coli* XL10-Gold Ultracompetent suministradas con el kit. La mezcla se cultivó en placas con Luria-Bertani + ampicilina (LBA) y se incubó a 37 °C durante la noche. Entonces se repitió el protocolo de mutagénesis dirigida a múltiples sitios para remediar el quinto error. Se

20

25

emplearon dos cebadores mutagénicos 5'-fosforilados purificados por PAGE o HPLC, identificados como SEC ID NO:57 y SEC ID NO:55. Dos transformantes se secuenciaron y mostraron 100% de homología con la secuencia de GenBank del gen *PXYLA*. Una de las construcciones se denominó pCM17 (figura 10). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del gen *PXYLA* reconstruidas se identifican como SEC ID NO:58 y SEC ID NO:59.

5 **Ejemplo 3A: Construcción del vector pCM14 (figura 11) que contiene el gen *PXYLA* bajo el control del promotor *KmPDC1* y del terminador *ScCYC1*, y el gen de resistencia a la higromicina *hph* de *E. coli* bajo el control del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10***

10 El gen *PXYLA* se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:60 y SEC ID NO:61, utilizando pCM17 (ejemplo 2B, figura 10) como molde. El termociclado se realizó con 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, 1,5 minutos a 72 °C, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 72 °C utilizando la ADN polimerasa *Pfx* (Invitrogen, CA). El producto de la PCR se digirió con *SbfI* y se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,0%. Se aisló un producto de 1319 pb y se acopló a un fragmento de aproximadamente 6829 pb obtenido digiriendo pCM9 con *SbfI*, para construir un plásmido de aproximadamente 8148 pb. Se empleó un cebador mutagénico identificado como SEC ID NO:62 para retirar un codón de fin que se había añadido involuntariamente en una posición inmediatamente cadena arriba del sitio *SbfI*, siguiendo el mismo protocolo que se describe en el ejemplo 2B, para crear un plásmido de aproximadamente 8148 pb (pCM14, figura 11).

20 El plásmido pCM14 contiene el gen *PXYLA* bajo el control del promotor *KmPDC1* y del terminador *ScCYC1*, con una cola de poli-his en el extremo 3' del gen. El plásmido también contiene el gen *hph* de *E. coli* bajo el control del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10*.

**Ejemplo 3B: Incorporación de un marcador de selección *Ura3* en el plásmido pCM14 (ejemplo 3A, figura 11), con la delección del módulo de expresión de *hgh***

25 Alani *et al.*, en "A method for gene disruption that allows repeated use of *Ura3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains" (Genetics, 1987, 116, 541-545) han descrito un método de integración de genes o alteración de genes. Este método emplea una cepa de levadura auxotrófica para el uracilo y un módulo repetidor *HisG-ScUra3-HisG*. Este módulo puede utilizarse como marcador de selección para introducir genes o para alterar genes con la ventaja de que el módulo de *HisG* se recombina consigo mismo en posteriores generaciones. Así, la célula de levadura pierde el gen *ScUra3* durante el acontecimiento de recombinación y esta pérdida del gen *ScUra3* restablece la auxotrofia para el uracilo de la cepa de levadura para la posterior transformación con el mismo módulo.

30 Se obtuvo un módulo *HisG-ScUra3-HisG* de Nancy DaSilva que está incorporado en un plásmido denominado pNADF11 (Nancy DaSilva, UC Irvine, California). El módulo *HisG-ScUra3-HisG* se aisló de pNADF11 digiriendo el plásmido con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* y acoplado un fragmento de aproximadamente 3,8 kpb al plásmido digerido con *BamHI* y *EcoRI* pPUC19 (New England Biolabs, EEUU). El plásmido resultante se denominó pVR65 (figura 19).

35 El plásmido pCM14 (ejemplo 3A, figura 11) se digirió con *AatII/SphI* y se separó electroforéticamente en un gel al 1%. Se aisló un fragmento de aproximadamente 5907 pb que contenía el módulo de *PXYLA*. El plásmido pVR65 se digirió con *AatII/SphI* y se separó electroforéticamente en un gel al 1%. Se aisló un fragmento de *HisG-ScUra3-HisG* de aproximadamente 4293 pb y se acopló a un fragmento de aproximadamente 5907 del plásmido pCM14, con los insertos aislados. El vector resultante se identificó como pCM28 (figura 12). Contiene el gen *PXYLA* (con el marcador de poli-his) bajo el control del promotor *KmPDC1* y del terminador *ScCYC1*, y el módulo *HisG-ScUra3-HisG*. El gen *hph* de *E. coli* y las porciones flanqueantes que estaban presentes en el plásmido pCM14 se eliminan de pCM28.

**Ejemplo 4A: Clonación del gen de la xilosa reductasa de *Kluyveromyces marxianus* (*KmXYL1*) y flancos cadena arriba y cadena abajo**

45 Se ha determinado un fragmento de 410 pb de una región codificadora putativa de la xilosa reductasa de *K. marxianus* (*KmXYL1*) y aproximadamente 500 pb del promotor mediante la secuenciación parcial del genoma de un *K. marxianus* similar dentro del proyecto Génolevures (Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, Bertrand Llorente, Alain Malpertuy, Gaëlle Blandin, François Artiguenave, Patrick Wincker y Bernard Dujon, *FEBS Letters*, 487(1), pp. 71-75). Basándose en esta secuencia y en algunas de las secuencias conocidas de otros consensos de xilosa reductasa de levaduras, se diseñaron cebadores para aislar el promotor y la secuencia del gen *KmXYL1* completo. Se empleó una estrategia de paseo genómico para obtener las secuencias cadena arriba y cadena abajo de una secuencia del gen *KmXYL1* a partir de una cepa de tipo salvaje de *K. marxianus*. Se utilizó un kit de paseo genómico (BD Biosciences, Palo Alto, CA) para obtener la secuencia de los flancos cadena arriba y cadena abajo. El ADN genómico de *K. marxianus* se digirió con enzimas de restricción del kit de paseo genómico (Invitrogen, CA). Se empleó un banco genómico fabricado con los fragmentos, como molde para las reacciones de PCR.

Se diseñaron cebadores de PCR identificados como SEC ID NO:63 y SEC ID NO:64 para que pasearan por el

extremo 5' y el extremo 3' para obtener el gen de la xilosa reductasa y las secuencias flanqueantes cadena arriba/cadena abajo. Estos cebadores se utilizaron para pasear junto con los cebadores AP1 y AP2 del kit de paseo genómico (BD Biosciences, CA). Este conjunto de cebadores amplifica un fragmento de aproximadamente 2,5 kpb cadena arriba del gen. El fragmento se secuenció para revelar la secuencia de ADN desde los extremos finales de la región cadena arriba hacia el gen *KmXYL1*. De forma similar, se emplearon los cebadores identificados como SEC ID NO:65 y SEC ID NO:66 para pasear junto con los cebadores AP1 y AP2 del kit de paseo genómico. Estos amplificaron un fragmento de aproximadamente 1,8 kpb cadena abajo del gen *KmXYL1*. El fragmento se secuenció para revelar la secuencia de ADN desde los extremos finales de la región cadena abajo desde la xilosa reductasa.

La información de secuencia obtenida del paseo genómico permitió el diseño de los cebadores identificados como SEC ID NO:67 y SEC ID NO:68. Estos cebadores se utilizan para reacciones de termociclado con 500 ng de ADN genómico de *K. marxianus*. El termociclado se realizó con 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C, 3 minutos a 72 °C, seguido de una incubación final de 7 minutos a 72 °C utilizando la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, CA). El producto de la PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa al 0,8%. Se aisló un producto de aproximadamente 3,5 kpb y se acopló en el vector de clonación TOPO pCRII para producir el plásmido pVR95 (figura 13).

**Ejemplo 4B: Construcción del plásmido pCM19 (figura 14b) que contiene los flancos cadena arriba y cadena abajo de *KmXYL1*, y el gen marcador de la resistencia a G418 bajo el control del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10***

Se diseñaron los cebadores identificados como SEC ID NO:69 y SEC ID NO:70 para amplificar un fragmento de aproximadamente 1,3 kpb del plásmido pVR95 (ejemplo 4A, figura 13). Este fragmento incluye la región promotora del gen *KmXYL1*, así como aproximadamente 300 pb de la región codificadora del gen. Estos cebadores se utilizaron para reacciones de termociclado con 50 ng de ADN plasmídico de pVR95 (ejemplo 4A, figura 13). El termociclado se realizó con 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 53 °C, 1 minuto a 68 °C, y una incubación final de 8 minutos a 68 °C utilizando la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, CA). El producto de la PCR se separó electroforéticamente, se digirió con *PstI* y se acopló a pVR29 (ejemplo 1C, figura 4) que también se había digerido con *PstI*. El plásmido obtenido mediante este método se verificó para la orientación correcta del gen *KmXYL1* y la región promotora en el vector pVR29. El plásmido se denominó pCM18 (figura 14a).

Se diseñaron los cebadores identificados como SEC ID NO:71 y SEC ID NO:72 para amplificar un fragmento de aproximadamente 1,1 kpb del plásmido pVR95. Este fragmento incluye una región cadena abajo del gen *KmXYL1*, más allá de su terminador. Estos cebadores se utilizaron para reacciones de termociclado con 50 ng de ADN plasmídico de pVR95. El termociclado se realizó con 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 59 °C, 1 minuto a 68 °C, y una incubación final de 8 minutos a 68 °C utilizando la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, CA). Los cebadores identificados como SEC ID NO:73 y SEC ID NO:74 se emplearon para reacciones de termociclado con 50 ng del primer producto de la PCR descrito anteriormente para amplificarlo. El termociclado se realizó con 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 45 °C, 1 minuto a 68 °C, y una incubación final de 8 minutos a 68 °C utilizando la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, CA). El producto de la PCR obtenido después del segundo termociclado se separó electroforéticamente, se digirió con *Apal* y se acopló al plásmido pCM18 que también se había digerido con *Apal*, para formar el vector pCM19 (figura 14b). El plásmido pCM19 contenía el flanco cadena abajo del gen *KmXYL1* y el flanco cadena arriba del gen *KmXYL1* (junto con aproximadamente 300 pb de la región codificadora del gen), separados por un módulo que contiene el gen G418 bajo el control del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10*. Se verificó la orientación correcta de la región cadena abajo de *KmXYL1* con respecto al gen de resistencia a G418.

**Ejemplo 4C: Construcción del auxótrofo para el uracilo de *K. marxianus* (CD683) sustituyendo un gen *Ura3* funcional por un gen no funcional**

El gen *Ura3* de *K. marxianus* (*KmUra3*) se aisló utilizando el ADN genómico como molde y cebadores diseñados basándose en una secuencia de GenBank (n° de registro AF528508). Un fragmento de 804 pb se clonó en el vector pBluescript (Stratagene, Wisconsin) y pBSKura3Myra marcado (figura 15).

Este plásmido se digirió con *EcoRV* y se aisló un fragmento de aproximadamente 4 kpb que tiene el gen *KmUra3* sin un fragmento *EcoRV*, y se reacopló para formar el plásmido pBSDeltaUra3Km (figura 15). Este plásmido tiene un gen no funcional (*DeltaUra3*). El plásmido se digirió utilizando *KpnI* y *NotI* y se empleó para transformar una cepa de tipo salvaje de *K. marxianus*. Los transformantes se seleccionaron en placas 5-FOA. Las colonias que crecieron sobre estas placas se seleccionaron utilizando cebadores diseñados en la misma región del gen *DeltaUra3*. También se diseñaron cebadores para aislar el gen completo y estos fragmentos se secuenciaron para indicar que este nuevo gen *DeltaUra3* no funcional más corto había reemplazado al gen *KmUra3* nativo real en los transformantes. Las cepas que se había transformado con éxito se denominaron CD683. La cepa CD683 no crece en placas Sc-Ura, lo cual indica que es un auxótrofo para el uracilo.

**Ejemplo 4D: Generación de un mutante de *K. marxianus* (CD804) con el gen de la xilosa reductasa (*KmXYL1*) delecionado mediante la transformación de la cepa CD683 (ejemplo 4C) con el plásmido pCM19 (ejemplo 4B, figura 14b)**



Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 5,2 kpb que contiene las regiones cadena arriba y cadena abajo del gen *KmXYL1* con un módulo de expresión de resistencia a G418 entre ambas, mediante la digestión de pCM19 con *PvuII*. Se utilizó este fragmento para transformar la cepa CD683 de *K. marxianus* utilizando métodos de electroporación convencionales. Las células transformadas se recuperaron y se cultivaron en placas con extracto de levadura 10 g/l, peptona de levadura 20 g/l, glucosa 50 g/l (YPD) + G418 50 µg/ml, y se incubaron a 37 °C durante 48-96 horas. Se realizó una réplica del cultivo de 96 transformantes que crecían sobre YPD + G418 50 µg/ml sobre placas con YPX (extracto de levadura 10 g/l, peptona de levadura 20 g/l + xilosa 50 g/l) + G418 50 µg/ml. De los 96 transformantes, 73 no crecieron en las placas con YPX + G418 50 µg/ml, lo cual confirma su incapacidad para utilizar la xilosa como fuente de carbono. Esta incapacidad indica que el gen *KmXYL1* funcional ha sido deletado y sustituido por el módulo de G418 en una recombinación homóloga. Los transformantes que no pueden utilizar xilosa como fuente de carbono se denominan CD804.

La ausencia de un gen *KmXYL1* funcional se verificó utilizando los cebadores de la PCR identificados como SEC ID NO:75 y SEC ID NO:76, que se diseñaron para amplificar mediante PCR el centro del gen *KmXYL1*. La presencia del gen G418 se verificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:77 y SEC ID NO:78. Los resultados indican que el fragmento del gen de resistencia al G418 se había integrado en el locus del gen *KmXYL1*. Otra PCR empleando un conjunto de cebadores identificados como SEC ID NO:79 y SEC ID NO:80 también confirma que el fragmento del gen de resistencia al G418 ha reemplazado al gen *KmXYL1* nativo. Un análisis de la transferencia Southern también confirma que el gen de la xilosa reductasa ha sido eliminado de la cepa CD804.

#### **Ejemplo 4E: Ensayo de la actividad de la enzima xilosa reductasa para las cepas CD683 (ejemplo 4C) y CD804 (ejemplo 4D)**

Se inocularon distintos matraces de agitación amortiguados (capacidad de 250 ml) con las cepas CD683 (ejemplo 4C) y CD804 (ejemplo 4D). Los matraces se incubaron a 35 °C con agitación a 250 rpm y se cultivaron durante la noche. El medio consistió en extracto de levadura 20 g/l, peptona 10 g/l, y dextrosa 100 g/l. Después de 18 horas, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 4000 g durante 5 minutos, se lavaron con tampón fosfato de sodio 100 mM, y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de ruptura. El tampón de ruptura consiste en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), ditiotreitól 1 mM (DTT), 40 mg de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (disuelto en 500 µl de DMSO), y 4 comprimidos de cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, CA) en un volumen de 200 µl. Las células se lisaron mecánicamente utilizando esferas de vidrio (Invitrogen, CA) y se centrifugaron a 14.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se retiró y se ensayó en una columna desaladora PD-10 según el protocolo del kit (Amersham Bioscience). La disolución de ensayo de la enzima XR consistió en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), NADPH 0,2 mM, D-xilosa 0,5 mM, en un volumen total de 1 ml, a la cual se le añadieron cantidades variables de la disolución enzimática, y se siguió la absorbancia a 340 nm. El uso del NADPH indica la actividad de la enzima reductasa. Se empleó una disolución de blanco sin xilosa para determinar la utilización de NADPH de fondo.

Se determinaron las proteínas totales utilizando el reactivo Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton nº ADV01) con BSA como patrón. La actividad de la enzima xilosa reductasa de la cepa CD683, según indica el consumo de NADPH, fue de 13,7 mU/mg de proteína. El consumo de NADPH de la cepa CD804 es coherente con una actividad xilosa reductasa de 4,4 mU/mg de proteína, en lugar de la actividad cero esperada. Esta utilización de NADPH por CD804 se atribuye a una enzima aldosa reductasa no específica que está realizando alguna conversión de xilosa a xilulosa. Las cepas CD683 y CD804 se cultivan una junto a la otra en placas YPX. La cepa CD804 no mostró crecimiento en estas placas tras 4 días, mientras que la cepa CD683 creció sin problemas en estas placas.

#### **Ejemplo 5A: Construcción del plásmido pVR67 (figura 16) que contiene un gen de xiluloquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScXKS1*)**

Se obtuvieron células de *S. cerevisiae* de the American Type Culture Collection (ATCC nº de registro 38626) y se cultivaron bajo condiciones convencionales. Se extrajo el ADN genómico de *S. cerevisiae* utilizando metodologías convencionales. Se realizaron reacciones de amplificación con PCR utilizando la polimerasa Pfx (Invitrogen, CA). Cada reacción contenía ADN genómico de *S. cerevisiae* a una concentración de 500 ng, cada uno de los cuatro dNTP (es decir, dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a una concentración de 0,2 mM, y cada uno de los cebadores de la amplificación identificados como SEC ID NO:81 y SEC ID NO:82 a 1 µM. El ciclado se realizó mediante una incubación inicial durante 10 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos que consisten en 15 segundos a 94 °C, 15 segundos a 55 °C, y 90 segundos a 68 °C. Un fragmento de aproximadamente 1,8 kpb se purificó en gel utilizando procedimientos convencionales y se clonó en el vector de clonación TA (Invitrogen, CA). El plásmido resultante (pVR67, figura 16) se secuenció para verificar la secuencia del gen *ScXKS1*. El gen muestra una excelente homología con la secuencia conocida en GenBank (nº de registro X61377). La secuencia de nucleótidos del gen *ScXKS1* se identifica como SEC ID NO:83. La secuencia de aminoácidos de la enzima codificada por este gen se identifica como SEC ID NO:84.

#### **Ejemplo 5B: Construcción del plásmido pVR52 (figura 16) que contiene el promotor de *TEF1* de *S. cerevisiae* (*ScTEF1*) y el terminador *ScGAL10***

El promotor de *TEF1* de *S. cerevisiae* (*ScTEF1*) se clonó del vector pTEFZeo (Invitrogen, CA). Se emplearon los cebadores identificados como SEC ID NO:85 y SEC ID NO:86 para amplificar el promotor *ScTEF1* e insertar los sitios de restricción *XbaI* y *SstI*. El producto de la PCR y el plásmido pNC2 (ejemplo 1A, figura 1) se digirieron con las enzimas *XbaI* y *SstI* y se acoplaron para obtener el plásmido pVR52 (figura 16).

5 **Ejemplo 5C: Construcción del plásmido pVR103 (figura 18) que contiene el gen *ScXKS1* bajo el control del promotor *ScTEF1* y del terminador *ScGAL10***

El plásmido pVR67 (ejemplo 5A, figura 16) se digirió con *XbaI* y *BamHI*. Un fragmento de aproximadamente 1,8 kpb que contiene el gen *ScXKS1* se purificó en gel. El plásmido pVR52 (ejemplo 5B, figura 16) también se digirió con *XbaI* y *BamHI*, y el fragmento obtenido se acopló al fragmento de aproximadamente 1,8 kpb de pVR67 para formar el vector plasmídico pVR96 (figura 16). Este plásmido contiene el gen *ScXKS1* bajo el control del promotor *ScTEF1* y del terminador *ScGAL10*. En este vector, el sitio de inicio ATG del gen *ScXKS1* está a aproximadamente 130 pb del final del promotor *ScTEF1*. Para reducir esta distancia a aproximadamente 70-73 pb se diseñaron los cebadores identificados como SEC ID NO:87 y SEC ID NO:88 que pudiesen amplificar el promotor *ScTEF1* del vector pTEFzeo con la distancia y los sitios de restricción correctos. Se empleó pTEFzeo (Invitrogen, CA) como molde. El termociclado se realizó con 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 57 °C, y 30 segundos a 72 °C, seguido de una incubación final de 4 minutos a 72 °C utilizando el sistema de PCR Failsafe (Epicentre, Madison, WI). El producto de la PCR se separó en un gel de agarosa al 0,8% y se aisló un fragmento de 460 pb. Se realizó una segunda PCR para amplificar este fragmento utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:89 y SEC ID NO:90. El producto de la PCR se digirió con *EcoRI* y se acopló al plásmido pVR96 digerido con *EcoRI* (figura 16). El plásmido resultante (pVR102, figura 17) tiene dos promotores *ScTEF1*, y el segundo es el que controla el gen *ScXKS1*. La distancia entre el final del promotor y el ATG del gen es exactamente de 73 pb. El plásmido pVR102 se digirió con *SphI* y se acopló al pPUC19 digerido con *SphI* (New England Biolabs, EEUU). El plásmido resultante (pVR103, figura 18) se secuenció para verificar el gen *ScXKS1* bajo el control del promotor *ScTEF1* y del terminador *ScGAL10*.

25 **Ejemplo 5D: Construcción del plásmido pVR104 (figura 19) que contiene el módulo de expresión *ScXKS1* (de pVR103, ejemplo 5C) junto con el módulo *HisG-ScUra3-HisG* (de pVR65, ejemplo 3B)**

El plásmido pVR65 (ejemplo 3B, figura 19) se digirió con *SphI*, y los extremos 5'-fosfato del vector linealizado se desfosforilaron utilizando fosfatasa alcalina de camarón (Roche Diagnostics, EEUU) siguiendo el protocolo del fabricante.

30 El plásmido pVR103 (ejemplo 5C, figura 18) también se digirió con *SphI*, y un fragmento de 3,5 kpb que tiene el gen *ScXKS1* bajo el control del promotor *ScTEF1* y del terminador *ScGAL10* se acopló al fragmento de pVR65 linealizado para obtener el plásmido pVR104 (figura 19).

**Ejemplo 5E: Generación de un mutante de *K. marxianus* (CD805) que tiene una actividad del gen *ScXKS1* sobreexpresada y el gen de la xilosa reductasa deletado por la cepa transformante CD804 (ejemplo 4D)**

35 Se empleó un fragmento *PvuII* de aproximadamente 6,8 kpb del plásmido pVR104 (ejemplo 5D, figura 19) para transformar la cepa CD804 (ejemplo 4D), utilizando métodos de electroporación convencionales. Las células transformadas se recuperaron en el medio YPD, se cultivaron en placa después de 4 horas sobre placas SC-Ura (Qbiogene, CA) y se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas. Los transformantes que crecieron sobre placas SC-Ura tras 72 horas se volvieron a sembrar en estrías sobre placas SC-Ura frescas. Los transformantes sembrados de nuevo en estrías se seleccionaron utilizando PCR de colonias.

40 Una única colonia positiva de la cepa transformada se inoculó en 50 ml de medio YPD y se incubó durante la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Se cultivaron 10 µl sobre placas 5-FOA y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las colonias que crecieron fueron resistentes a 5-FOA y se prevé que han perdido su gen *ScUra3* debido a la recombinación de las regiones HisG. Se realizó una PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:91 y SEC ID NO:92 para amplificar una región de 700 pb para indicar un gen *ScXKS1* intacto y aproximadamente 1 kb del gen HisG. Se diseñó un segundo conjunto de cebadores identificados como SEC ID NO:93 y SEC ID NO:94 para amplificar un producto de aproximadamente 1 kpb entre el *ScXKS1* y el final del gen. Estos dos conjuntos de cebadores confirman que el gen *ScXKS1* se ha integrado en el cromosoma de los transformantes y que el gen *ScUra3* ha sido eliminado por la recombinación espontánea de la región HisG. Esta cepa se denominó CD805 y se volvió a ensayar para determinar si había una mayor actividad de proteína xiluloquinasa.

45 Se diseñaron los cebadores identificados como SEC ID NO:91 y SEC ID NO:93 para amplificar un producto de aproximadamente 2,6 kpb entre el promotor *ScTEF1* y el final del gen *ScXKS1*. Se diseñaron los cebadores identificados como SEC ID NO:92 y SEC ID NO:95 para amplificar un producto de aproximadamente 1,7 kpb entre el gen *ScXKS1* y el inicio del fragmento. Estos dos conjuntos de cebadores confirman que el gen *ScXKS1* se ha integrado en el cromosoma de la cepa CD805.

50 **Ensayo de la actividad xiluloquinasa:** Se inocularon diferentes matraces de agitación amortiguados (capacidad de 250 ml) con las cepas CD804 (ejemplo 4D) y CD805 (ejemplo 5E). Los matraces se colocaron a 35 °C, se

agitaron a 250 rpm y se cultivaron durante la noche. El medio consistió en extracto de levadura 20 g/l, peptona 10 g/l, y dextrosa 100 g/l. Después de 16 horas, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 4000 g durante 5 minutos, se lavaron con tampón fosfato de sodio 100 mM, y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de ruptura. El tampón de ruptura consiste en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), DTT 1 mM, 40 mg de PMSF (disuelto en 500 µl de DMSO), y 4 comprimidos de cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) en un volumen de 200 ml. Las células se lisaron mecánicamente utilizando esferas de vidrio (Invitrogen, CA) y se centrifugaron a 14.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se retiró y se ensayó en una columna desaladora PD-10 según el protocolo del kit (Amersham Bioscience). Se añadieron 10 µl de extracto a una mezcla de 80 µl de XuK equilibrada a 30 °C (que contenía 61 mg de Na<sub>2</sub>ATP·3H<sub>2</sub>O, 10,0 ml de HEPES 0,1 M/KOH (pH 7,5), 1,2 ml de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M (diluido hasta 16,0 ml), y 10 µl de xilulosa 20 mM para un volumen total de 100 ml. Se sustituye a la xilulosa por agua para el blanco. Las reacciones se terminan hirviendo durante dos minutos y trasladándose a hielo. Se añadieron 900 µl de Hek2 (HEPES 40 mM/KOH (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PEP 2,5 mM, y NADH 0,2 mM) y se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se trasladó a una cubeta de espectrofotómetro, y se estableció la absorbancia en la línea de base a 340 nm inicial. Se añadieron 10 µl de una mezcla 1:1:1 de mioquinasa, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa y se midió la absorbancia final. Se determinaron las proteínas totales utilizando el reactivo Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton n° ADV01) con BSA como patrón. La medición de la actividad xiluloquinasa para la cepa CD804 fue de 69,7 ± 8,0 mU/mg, mientras que para la cepa CD805 fue de 400,8 ± 102,7 mU/mg, lo cual indica que CD805 tiene una actividad *ScXKS1* sobreexpresada.

**Ejemplo 6A: Construcción del plásmido pCM23 (figura 20) que contiene los flancos cadena arriba y cadena abajo de un gen de xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus* (*KmXYL2*), y un gen *hgh* de *E. coli* bajo el control del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10***

Un fragmento de 988 pb que contiene la región promotora del gen de xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus* (*KmXYL2*) se amplificó mediante PCR desde el genoma con los cebadores indicados como SEC ID NO:96 y SEC ID NO:97. El termociclado se realizó con 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C, 1 min a 68 °C, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 68 °C utilizando la ADN polimerasa *Pfx* (Invitrogen, CA). El producto se clonó en un vector TOPOII (Invitrogen, CA). El plásmido pUC19 (New England Biolabs, EEUU) se digirió con *EcoRI* y se separó en un gel al 1,0%. Se aisló una banda de 2,686 kpb del plásmido pUC19 y se acopló a un fragmento liberado del plásmido TOPOII mediante una digestión con *EcoRI*, creando un plásmido de aproximadamente 3,674 kpb denominado pCM20.

Un fragmento que contiene la secuencia terminadora y la región cadena abajo de *KmXYL2* se amplificó mediante PCR desde el genoma utilizando tres conjuntos de cebadores. El primer conjunto de cebadores se identifica como SEC ID NO:98 y SEC ID NO:99, que amplifica la región cadena abajo de interés. El termociclado se realizó con 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, y 1 minuto a 68 °C, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 68 °C utilizando la ADN polimerasa *Pfx* (Invitrogen, CA). El segundo conjunto de cebadores se identifica como SEC ID NO:100 y SEC ID NO:101. Estos se utilizaron para introducir sitios *SphI* en ambos extremos utilizando 2,5 µl del primer producto de la PCR como molde de ADN. El termociclado se realizó con 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C, y 1 minuto a 68 °C, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 68 °C utilizando la ADN polimerasa *Pfx*. El tercer conjunto de cebadores se identifica como SEC ID NO:102 y SEC ID NO:103. Estos amplifican el producto previo utilizando 2,5 µl de la segunda PCR. El termociclado se realizó con 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 47 °C, y 1 minuto a 68 °C, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 68 °C utilizando la ADN polimerasa *Pfx*. El producto final se clonó en un vector TOPOII (Invitrogen, CA) y se digirió con *SphI* y se separó en un gel al 1,0%. Se aisló un fragmento de aproximadamente 1,008 kpb y se acopló en el plásmido pCM20 digerido con *SphI* (de antes) para formar un plásmido de aproximadamente 4,682 kpb denominado pCM21 (figura 20).

El plásmido pCM21 se digirió con *SacI/XbaI* y se separó en un gel al 1,0%. Se aisló una banda de aproximadamente 4,665 kpb y se acopló a una banda de aproximadamente 2,366 kpb aislada digiriendo el plásmido pPS1 (ejemplo 1H, figura 8) con *SacI/SpeI*. El plásmido de aproximadamente 7,031 kpb resultante se denominó pCM23 (figura 20). Contiene los flancos cadena arriba y cadena abajo del gen *KmXYL2*, separados por un gen *hph* de *E. coli* bajo el control transcripcional del promotor *ScPDC1* y del terminador *ScGAL10*.

**Ejemplo 6B: Generación de un mutante de *K. marxianus* (CD806) a partir de la cepa CD805 (ejemplo 5E) utilizando un fragmento del plásmido pCM23 (ejemplo 6A, figura 20) para deleccionar el gen de xilitol deshidrogenasa**

Una única colonia de la cepa CD805 se transformó con un fragmento procedente del plásmido pCM23 utilizando métodos de electroporación convencionales. Las células transformadas se recuperaron en medio YPD y se cultivaron después de 4 horas en placas con YPD + higromicina 150 µg/ml, y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Ochenta y seis transformantes que crecieron en las placas de YPD + higromicina 150 µg/ml después de 48 horas se volvieron a sembrar en estrías sobre placas frescas de YPD + higromicina 150 µg/ml. Los transformantes se seleccionaron mediante PCR para la presencia de la xilitol deshidrogenasa nativa con los cebadores identificados como SEC ID NO:104 y SEC ID NO:105. El termociclado se realizó con un ciclo inicial de 10 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C, 1 minuto a 72 °C, seguido de una incubación final durante 8

minutos a 72 °C utilizando la enzima Failsafe (Epicentre, Wisconsin). Un producto de la PCR de 1064 pb indica un gen de xilitol deshidrogenasa intacto. Quince transformantes no produjeron el producto esperado, lo cual indica que el gen de la xilitol deshidrogenasa se ha deletado con éxito de estos 15 transformantes.

Estos 15 transformantes se seleccionaron mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:106 y SEC ID NO:107. Este conjunto de cebadores se diseñó para amplificar con PCR los extremos 5'. Un resultado positivo (fragmento de aproximadamente 1,5 kpb) indica que el fragmento del gen de resistencia a la higromicina sustituye al gen *KmXYL2* en el cromosoma de los transformantes en un entrecruzamiento 5'. Se diseñó un tercer conjunto de cebadores identificados como SEC ID NO:108 y SEC ID NO:109 para amplificar con PCR los extremos 3'. Un producto de aproximadamente 1 kpb indica que el fragmento del gen de resistencia a la higromicina sustituye al gen *KmXYL2* en el cromosoma de los transformantes en un entrecruzamiento 3'. De los 15 transformantes, dos mostraron una bandas que se corresponden con ambos productos de la PCR. Uno de estos es la cepa CD806. La cepa CD806 tiene actividad del gen *ScXKS1* sobreexpresada, y genes de la xilosa deshidrogenasa (*KmXYL2*) y de la xilosa reductasa (*KmXYL1*) deletados.

**Ensayo de la actividad xilitol deshidrogenasa:** Se inocularon diferentes matraces de agitación amortiguados (capacidad de 250 ml) con las cepas CD805 (ejemplo 5E) y CD806 (ejemplo 6B). Los matraces se colocaron a 33 °C, se agitaron a 250 rpm y se cultivaron durante la noche. El medio consistió en extracto de levadura 20 g/l, peptona 10 g/l, y dextrosa 100 g/l. Después de 16 horas, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 4000 g durante 5 minutos, se lavaron con tampón fosfato de sodio 100 mM, y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de ruptura. El tampón de ruptura consiste en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), DTT 1 mM, 40 mg de PMSF (disuelto en 500 µl de DMSO), y 4 comprimidos de cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) en un volumen de 200 ml. Las células se lisaron mecánicamente utilizando esferas de vidrio (Invitrogen, CA) y se centrifugaron a 14.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se retiró y se ensayó en una columna desaladora PD-10 según el protocolo del kit (Amersham Bioscience). Se añadió la muestra a la disolución de ensayo que consistía en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), NADH 0,2 mM, y xilulosa 20 mM. Se siguió la absorbancia a 340 nm. Se determinaron las proteínas totales utilizando el reactivo Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton nº ADV01) con BSA como patrón. El análisis enzimático de la cepa CD805 (ejemplo 5E) produjo una actividad enzimática de  $14,5 \pm 1,6$  mU/mg, mientras que la actividad de la cepa CD806 fue de  $0,0 \pm 0,1$  mU/mg. Estos resultados indican que la actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa se ha deletado en la cepa CD806.

**Ejemplo 7A: Generación de un mutante de *K. marxianus* (CD882) que tiene el gen *PXYLA* exógeno, una actividad del gen *ScXCS1* sobreexpresada, y deletaciones de los genes *KmXYL1* y *KmXYL2* mediante la transformación de la cepa CD806 (ejemplo 6B) con el plásmido pCM28 (ejemplo 3B, figura 12)**

Una única colonia de la cepa CD806 se transformó con el plásmido pCM28 digerido con *NaeI* utilizando métodos de electroporación convencionales. Los transformantes se cultivaron a 37 °C durante la noche, y se sembraron en estrías en cinco placas Sc-Ura idénticas para la selección. La presencia del gen *PXYLA* se verificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:110 y SEC ID NO:111. El transformante resultante (denominado CD882) contiene el gen *PXYLA* reconstruido, una actividad del gen *ScXCS1* sobreexpresada, y deletaciones de los genes *KmXYL1* y *KmXYL2*.

**Ejemplo 7B: Análisis enzimático y de la transferencia Western de la cepa CD882 (ejemplo 7A)**

Las proteínas de CD882 se purificaron en columna utilizando la resina quelante de  $Ni^{2+}$  Probond (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) que se une a la cola de poli-his 6X. Se empleó una sonda conjugada Ni-NTA-HRP (Qiagen, Valencia, CA, EEUU) para la detección directa de proteínas marcadas. El análisis de la transferencia Western de las fracciones recogidas durante la purificación también confirma la presencia de la proteína XI en la cepa CD882. Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron según el método descrito en "The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*", Gardonyl *et al.*, 2003. La evaluación confirma la actividad xilosa isomerasa en la misma fracción en la que se detecta la cola de poli-his 6X del gen *PXYLA* mediante el análisis de la transferencia Western en la cepa CD882.

**Ejemplo 8A: Construcción del plásmido (pCM29, figura 21) que contiene el gen *PXYLA* reconstruido con el codón de fin que evita la codificación de la cola de poli-his**

El gen *PXYLA* reconstruido (ejemplo 2A) se amplificó con PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:112 y SEC ID NO:113 empleando pCM17 (ejemplo 2B, figura 10) como molde. El termociclado se realizó con 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, 1,5 minutos a 72 °C, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 72 °C utilizando la ADN polimerasa *Pfx*. El producto de la PCR se digirió con *SbfI* y se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,0%. Se aisló un producto de 1319 pb y se acopló a un fragmento de 6829 pb obtenido digiriendo el plásmido pCM9 (ejemplo 11, figura 9) con *SbfI* para construir un plásmido de aproximadamente 8148 pb (pCM29, figura 21). El plásmido contenía el gen *PXYLA* con una cola poli-his inoperable, bajo el control del promotor *KmPCD1* y del terminador *ScCYC1*, y el módulo de expresión de hph de *E. coli*.

**Ejemplo 8B: Generación de una cepa mutante de *K. marxianus* (CD861) que contiene el gen *PXYLA* no marcado con his, una actividad del gen *ScXKS1* sobreexpresada, y los genes de la xilosa deshidrogenasa y**

**de la xilosa reductasa delecionados, mediante la transformación de la cepa CD806 (ejemplo 6B) con el plásmido pCM29 (ejemplo 8A, figura 21)**

Se empleó un fragmento *PvuII/SphI* de 3,192 kb obtenido digiriendo pCM29 para transformar la cepa CD806, utilizando métodos de electroporación convencionales. Las células transformadas se recuperaron en medio YPD y se cultivaron después de 6 horas en YPX + G418 300 µg/ml + higromicina 150 µg/ml (pH 7,0). Después de 5 días a 30 °C habían crecido varios cientos de pequeñas colonias y una colonia grande. La colonia grande se denominó CD861.

Se realizó un paseo genómico en la cepa CD861 para determinar cómo se ha integrado el gen *PXYLA*. Se descubrió que el gen *PXYLA* se había integrado con más de una copia inmediatamente cadena debajo de la región promotora del gen *PDC* nativo. Una copia estaba bajo el control de una región promotora *KmPDC1* de aproximadamente 1236 pb, presente en el plásmido pCM29, que incluye aproximadamente 142 pb de un gen cadena arriba, y el terminador *ScCYC1*. Otra copia estaba inmediatamente cadena debajo de este terminador *ScCYC1*, e incluye un promotor de 1026 pb que tiene la misma longitud que el promotor *KmPDC1* nativo. A este promotor le falta la región de 142 pb del gen cadena arriba y también aproximadamente 68 pb en el extremo 5', comparado con el promotor en pCM29 y la primera copia. La segunda copia también está bajo el control de un terminador *ScCYC1*. Inmediatamente cadena debajo de este segundo terminador *ScCYC1* está el promotor *KmPDC1* nativo de 1026 pb, seguido del gen *KmPDC1* nativo.

**Ejemplo 8C: Análisis enzimático de xilosa isomerasa, xilosa reductasa, xilitol deshidrogenasa y xiluloquinasa de CD861 (ejemplo 8B)**

Se inocularon diferentes matraces de agitación amortiguados (capacidad de 250 ml) con CD806 (ejemplo 6B) y CD861 (ejemplo 8B). Los matraces se incubaron a 30 °C, y se cultivaron durante la noche con agitación a 250 rpm. El medio consistió en extracto de levadura 20 g/l, peptona 10 g/l, y dextrosa 100 g/l, suplementado con G418 300 µg/ml e higromicina 150 µg/ml. Las células se lisaron utilizando una disolución Y-PER (Pierce-Rockford, IL), seguido de una desalación utilizando columnas PD-10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Una disolución de ensayo que consistía en TES-NaOH 100 mM, xilosa 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NADH 0,6 mM, 1 U de SDH (Sigma) (pH 7,0) se llevó a 1,0 ml con la adición de 100 µl del extracto celular. Se determinó la actividad xilosa isomerasa utilizando un blanco con la misma disolución de ensayo, solo que sin xilosa. La actividad xilosa isomerasa para la cepa CD806 fue cero, mientras que para la cepa CD861 fue de 1,07 ± 0,21 U/mg del extracto bruto. Esto verifica que la cepa CD861 contiene un gen de xilosa isomerasa funcionando.

También se realizaron ensayos de xilosa reductasa, xilitol deshidrogenasa y xiluloquinasa para verificar la actividad/pérdida de actividad en la cepa final. La cepa CD861 (ejemplo 8B) y la cepa CD683 (ejemplo 4C) se cultivaron por separado durante la noche en medio que consistía en extracto de levadura 20 g/l, peptona 10 g/l, y dextrosa 100 g/l (suplementado con G418 300 µg/ml e higromicina 150 µg/ml para la cepa CD861). Las células se lisaron utilizando la disolución Y-PER. Se determinaron las proteínas totales utilizando el reactivo Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton n° ADV01) con BSA como patrón. La actividad de la enzima xilosa reductasa de la cepa CD861 fue de 260 ± 41,8 mU/ml frente a 516,5 ± 10,6 mU/ml en la cepa CD683. La reducción en aproximadamente 50% de la actividad indica la deleción del gen de la xilosa reductasa, atribuyéndose la actividad medida a una enzima aldosa reductasa no específica que realiza algo de conversión de xilosa a xilulosa. La actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa fue de 12,4 ± 4,4 mU/ml para la cepa CD861 frente a 110,4 ± 7,2 mU/ml para la cepa CD683. La actividad de la enzima xiluloquinasa fue de 370,5 ± 147,6 mU/ml para la cepa CD861 frente a 44,8 ± 8,2 mU/ml para la cepa CD683.

**Ejemplo 8D: Análisis cinético del gen *PXYLA* en la cepa CD861 (ejemplo 8B)**

Una única colonia de la cepa CD861 se inoculó para un crecimiento durante la noche en medio que consistía en extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, y dextrosa 100 g/l. Las células se recolectaron mediante centrifugación, se lavaron una vez con 10 ml de fosfato de sodio 100 mM, PMSF 1 mM (pH 7,0), y se volvieron a centrifugar. A esto se le añadieron 2 ml de disolución Y-PER, se resuspendió con cuidado y la disolución celular se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación intermitente. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y el sobrenadante se desaló utilizando columnas PD-10 (Amersham Biosciences). Se realizaron ensayos enzimáticos como se describe en el ejemplo 8C, siendo la única diferencia que se cambia el sustrato a xilosa 0,05-10 mM. Se obtuvieron la  $K_m$  y la  $V_{max}$  a partir de gráficas de Michaelis-Menten, que produjeron una correspondiente  $V_{max}$  de aproximadamente 1,8 con una correspondiente  $K_m$  de xilosa 2,2 mM. Una gráfica de Linweaver-Burk produjo una correspondiente  $V_{max}$  de aproximadamente 1,0 con una correspondiente  $K_m$  de xilosa 1,2 mM.

**Ejemplo 8E: Estudios de inhibición de la actividad *PXYLA* en la cepa CD861 (ejemplo 8B) utilizando xilitol**

La cepa CD861 se cultivó en medio de xilosa que contenía diversas concentraciones de xilitol, un inhibidor de la xilosa isomerasa conocido. La  $K_m$  para la enzima xilosa isomerasa se duplica cuando los niveles de xilitol aumentan de 0 a 0,25 mM, y vuelven a duplicarse cuando los niveles de xilitol aumentan hasta 0,50 mM.

**Ejemplo 8F: Tolerancia al pH del gen *PXYLA* en la cepa CD861 (ejemplo 8B)**

Se inoculó una única colonia de CD861 para el crecimiento durante la noche en medio que consistía en extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, y dextrosa 100 g/l. Las células se recolectaron mediante centrifugación, se lavaron una vez con 10 ml de fosfato de sodio 100 mM, PMSF 1 mM (pH 7,0), y se volvieron a centrifugar. A esto se le añadieron 2 ml de disolución Y-PER, se resuspendió con cuidado y la disolución celular se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación intermitente. Las disoluciones de ensayo de duplicación consistieron en TES-NaOH 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NADH 0,6 mM, xilosa 250 mM y 1 U de SDH, respectivamente, ajustadas a pH 7,0, 6,6, 5,9, 4,6 y 3,8 utilizando ácido láctico 5 M (Sigma, EEUU) en un volumen de 900 µl. A esto se le añadieron 100 µl de la enzima o de una dilución de esta hasta un volumen final de 1 ml. La actividad enzimática se midió como en el ejemplo 8C. La actividad óptima se obtuvo a pH 6,5. A pH 5,9, la proteína mantiene 45% de la actividad máxima.

**Ejemplo 9A: Caracterización con matraces de agitación microaerobios de las cepas CD806 (ejemplo 6B), CD861 (ejemplo 8B) y CD882 (ejemplo 7A)**

Se inocularon por separado colonias individuales de las cepas CD806, CD861 y CD882 para un crecimiento durante la noche en 100 ml de medio que consistía en extracto de levadura 20 g/l, peptona 10 g/l, y dextrosa 100 g/l, suplementado con G418 300 µg/ml e higromicina 300 µg/ml. Se determinó el peso seco celular y se centrifugó el volumen apropiado de medio para 2 gramos de peso seco celular (gcdw) y se resuspendió en 50 ml de medio que consistía en peptona de levadura 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, xilosa 50 g/l y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, a pH 7,0. Las células se colocaron en un matraz de agitación amortiguado de 250 ml y se colocaron a 30 °C con agitación de 70 rpm. La cepa CD806 produce xilitol 0,7 g/l como único producto. La cepa CD882 produce xilitol 3,8 g/l, así como acetato 0,4 g/ml como únicos productos mensurables. La cepa CD861 produce etanol 13,5 g/l, xilitol 0,4 g/l y pequeñas cantidades de glicerol, acetato, y succínico (<2 g/l total).

**Ejemplo 9B: Caracterización con matraces de agitación de tubo de CD806 (ejemplo 6B), CD861 (ejemplo 8B) y CD882 (ejemplo 7A)**

Se inocularon por separado colonias individuales de las cepas CD806, CD861 y CD882 para un crecimiento durante la noche en 100 ml de medio que consistía en extracto de levadura 20 g/l, peptona 10 g/l, y dextrosa 100 g/l, suplementado con G418 300 µg/ml e higromicina 300 µg/ml. Se centrifugaron 50 ml del crecimiento durante la noche de cada cepa, después se resuspendió en 25 ml de medio de producción que consistía en peptona de levadura 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, xilosa 50 g/l y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, a pH 7. Se añadió una parte alícuota de 1 ml de la resuspensión celular a 45 ml de medio de producción en un tubo Falcon de 50 ml, y se tomó la DO inicial (véase el apéndice para los valores de DO). Esto se repitió varias veces para asegurar la recogida de las suficientes muestras a lo largo del experimento. Los tubos entonces se colocaron en condiciones de producción, 33 °C y 200 rpm. La cepa CD861 produce etanol 21 g/l y mostró una productividad volumétrica de 0,3 g/l-hr en estas condiciones. La cepa CD806 no consumió la xilosa. Las cepas CD861 y CD882 fueron ambas capaces de un crecimiento anaerobio.

**Ejemplo 10A: Construcción del plásmido pVR113 (figura 22) que contenía el gen de la L-lactato deshidrogenasa de *L. helveticus* (*LhLDH*) bajo el control del promotor *ScPGK* y del terminador *ScGAL10*, y el gen *ScUra3* sin las repeticiones His flanqueantes**

Se realizó una PCR utilizando el plásmido pCM28 (ejemplo 3B, figura 12) como molde y los cebadores identificados como SEC ID NO:114 y SEC ID NO:115, para introducir sitios *SphI* mientras que se eliminan las repeticiones HisG flanqueantes. El termociclado se realizó con un ciclo inicial de 10 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 45 °C, 1,4 minutos a 72 °C, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 72 °C utilizando la enzima ADN polimerasa Taq (Qiagen, EEUU). El plásmido resultante se digirió con *SphI* para obtener un fragmento de aproximadamente 1,45 kpb que contiene el gen *ScUra3* sin las repeticiones HisG flanqueantes.

Un plásmido (identificado como pVR39 en la figura 6 y el ejemplo 1E del documento WO 03/102152A1) que contiene el gen de la lactato deshidrogenasa de *L. helveticus* (*LhLDH*) bajo el control del promotor *ScPGK* y del terminador *ScGAL10*, y el gen marcador de la resistencia a G418 bajo el control del promotor *ScPGK* y del terminador *ScGAL10*, se digirió con *SphI* para crear un fragmento de aproximadamente 5,16 kpb. Este fragmento de aproximadamente 5,16 kpb se acopló al fragmento de aproximadamente 1,45 kpb anterior para formar un plásmido de aproximadamente 6,61 kpb (pVR113, figura 22).

**Ejemplo 10B: Generación de una cepa mutante de *K. marxianus* (CD896) que contiene el gen de la lactato deshidrogenasa exógeno, el gen *PXYLA* no marcado con his, una actividad del gen *ScXKS1* sobreexpresada, y genes de la xilosa deshidrogenasa y de la xilosa reductasa delecionados, mediante la transformación de la cepa CD861 (ejemplo 8B) con el plásmido pVR113 (ejemplo 10A, figura 22)**

Una única colonia de la cepa CD861 se transformó con el plásmido pVR113 utilizando métodos de electroporación convencionales. Las células transformadas se recuperaron en YPD durante 4 horas, seguido de un cultivo en placas Sc-Ura. Se seleccionó un transformante positivo (cepa CD896) mediante selección con PCR para el módulo

*LhLDH/ScUra3*. El transformante produjo unos resultados positivos en la PCR con cebadores de xilosa isomerasa y xiluloquinasa, y también negativos con cebadores de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa.

#### **Ejemplo 10C: Caracterización con matraces de agitación de la cepa CD896 (ejemplo 10B)**

5 Se inoculó una única colonia de la cepa CD896 (ejemplo 10B) en 50 ml de YPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, y glucosa 100 g/l en un matraz de agitación amortiguado de 250 ml) y se cultivó durante 16 horas a 250 rpm y 37 °C. A partir de este cultivo se inocularon 3 gdcw en YP (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l) con xilosa 50 g/l y CaCO<sub>3</sub> 23 g/l en matraces de agitación (microaerobios) y botellas de vidrio de 250 ml (anaerobias). Los matraces se incubaron a 42 °C y se retiraron muestras para la HPLC a intervalos aleatorios. La fermentación de la cepa CD896 bajo condiciones microaerobias produjo una titulación de ácido L-láctico de 39 g/l y rendimientos de 77%-79% sobre la xilosa consumida. La productividad volumétrica del ácido L-láctico producido fue de 1 g/l/hr, mientras que la velocidad de consumo inicial de xilosa fue de entre 1,0 y 1,4 g/l/hr. La fermentación de la cepa CD896 sobre YP + xilosa 50 g/l + carbonato de calcio 23 g/l bajo condiciones de producción anaerobias produjo ácido L-láctico 10 g/l en las primeras 24 horas, tras lo cual el consumo de xilosa se detuvo.

#### **Ejemplo 11A: Construcción de plásmidos duplicados que contienen el gen *PXYLA* reconstruido con la cola de poli-his codificada (pCM31, figura 23) y sin la cola de poli-his codificada (pVR118, figura 24), junto con el gen *ScUra3* sin las repeticiones His flanqueantes**

15 Este experimento se diseñó para aclarar el efecto del marcador de poli-his sobre la actividad del gen *PXYLA* reconstruido. Se digirieron 5 µg de pCM14 (ejemplo 3A, figura 11) con *SphI* y se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa al 1,0%. Se aisló un producto de aproximadamente 5889 pb y se acopló a un fragmento de 1450 pb obtenido digiriendo el plásmido pVR113 (ejemplo 10A, figura 22) con *SphI*, para formar un plásmido de aproximadamente 7339 pb (pCM31, figura 23). El plásmido pCM31 contiene el gen *PXYLA* con la cola de poli-his y bajo el control del promotor *KmPDC1* y del terminador *ScCYC1*, y el módulo de expresión *ScUra3*. Por otra parte, se digirieron 5 µg del plásmido pCM29 (ejemplo 8A, figura 21) con *SphI*, y se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa al 1,0%. Se aisló un producto de aproximadamente 5892 pb y se acopló a un fragmento de 1450 pb obtenido digiriendo el plásmido pVR113 con *SphI* para formar un plásmido de aproximadamente 7352 pb (pVR118, figura 24). El plásmido pVR118 es similar al plásmido pCM31 pero contiene un codón de fin que evita la codificación de la cola de poli-his.

#### **Ejemplo 11B: Generación de cepas mutantes de *K. marxianus* que contienen el gen *PXYLA* reconstruido con el marcador de poli-his (CD929) y sin el marcador de poli-his (CD931), junto con el gen *ScUra3* sin las repeticiones His flanqueantes, mediante la transformación de la cepa CD806 (ejemplo 6B) con los plásmidos pCM31 (ejemplo 11A, figura 23) y pVR118 (ejemplo 11A, figura 24)**

30 Una única colonia de la cepa CD806 de *K. marxianus* (ejemplo 6B) se transformó con el plásmido pCM31 utilizando métodos de electroporación convencionales. Las células transformadas se recuperaron del medio YPD y se cultivaron después de 4 horas sobre placas Sc-Ura. Se verificó mediante PCR que dos transformantes contenían el gen *PXYLA* reconstruido (con el marcador poli-his codificado) y que sobreexpresaban el gen *ScXKS1*, y también se confirmaron las deleciones de los genes *KmXYL1* y *KmXYL2*. Uno de estos transformantes se denominó cepa CD929.

35 La cepa CD806 de *K. marxianus* se transformó con el plásmido pVR118 utilizando métodos de electroporación convencionales. Un transformante, que mediante PCR se verificó que contenía el gen *PXYLA* reconstruido (sin el marcador de poli-his codificado) y que sobreexpresaba el gen *ScXKS1*, y que tenía las deleciones de los genes *KmXYL1* y *KmXYL2*, se denominó cepa CD931.

40 Un paseo genómico de la cepa CD931 demuestra que el gen *PXYLA* se había integrado dos veces, de la misma manera en que se describió para la cepa CD861 (ejemplo 8B).

#### **Ejemplo 11C: Caracterizaciones con matraces de agitación de las cepas CD929 y CD931 (ejemplo 11B)**

45 Se inocularon por separado colonias individuales de CD929 y CD931 (ejemplo 11B) en 100 ml de extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, glucosa 70 g/l, G418 300 µg/ml + higromicina 150 µg/ml en un matraz de agitación amortiguado de 250 ml. Los cultivos se incubaron durante la noche a 35 °C con 250 rpm. Las células se inocularon en tubos Falcon de 50 ml que contenían 45 ml de medio de producción (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, xilosa 50 g/l, Tes-NaOH 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,0) hasta una DO de 0,2. Los tubos se colocaron a 37 °C y 250 rpm, se tomaron muestras a intervalos aleatorios y se analizaron mediante HPLC. La cepa CD929 produjo EtOH 1,7 g/l y acumuló xilosa 1,1 g/l. La cepa CD931 produjo EtOH 15,2 g/l y acumuló xilulosa a 4,5 g/l. La actuación relativa de estas cepas indica que la formación de etanol es aproximadamente nueve veces mayor cuando el gen de la xilosa isomerasa no contiene el marcador de poli-his. De forma similar, la formación de xilulosa aumenta en cuatro veces cuando la cola de poli-his está ausente.

#### **Ejemplo 12A: Reinserción del gen *KmXYL2* en la cepa CD861 (ejemplo 8B) mediante la transformación con el plásmido pCM52 (figura 25); evaluaciones con matraces de agitación de los transformantes resultantes**

El gen *KmXYL2*, junto con 982 pb del flanco 5' y 200 pb del flanco 3' se amplificó a partir de ADN genómico de una cepa de *K. marxianus* de tipo salvaje, utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:116 y SEC ID NO:117. Estos cebadores introducen sitios de restricción *SacII*. El producto de la PCR resultante se digirió con *SacII* y se acopló a un plásmido tratado con fosfatasa alcalina de camarón digerido de modo similar pVR113 (ejemplo 10A, figura 22). El plásmido resultante se denominó pCM52 (figura 25). Se utilizaron los cebadores identificados como SEC ID NO:118 y SEC ID NO:119 para seleccionar pCM52. El gen *KxXYL2* amplificado se secuenció y se descubrió que contenía dos errores, uno de los cuales es silencioso y el otro provoca un cambio del aminoácido 85V→I.

El plásmido pCM52 se digirió con *PvuII* y se transformó en la cepa CD861 (ejemplo 8B) utilizando métodos de electroporación convencionales. Los transformantes se cultivaron en placas Sc-Ura y se incubaron a 37 °C. Se utilizaron los cebadores identificados como SEC ID NO:104 y SEC ID NO:105 para amplificar la región codificadora del gen *KmXYL2*. Se utilizaron los cebadores identificados como SEC ID NO:120 y SEC ID NO:121 para amplificar la región que contiene el gen *ScUra3* a través del flanco 5' y hacia la región codificadora del gen *KmXYL2*. Cinco transformantes positivos para ambas bandas y que muestran actividad *KmXDH* (transformantes XDH+) se utilizaron para el análisis con matraces de agitación. La actividad *KmXDH* de los transformantes XDH+ demostró que los errores introducidos en el gen no destruían la actividad.

Se obtuvieron aislados de cada uno de los cinco transformantes XDH+ haciendo dos transferencias en placas YPX. Los aislados entonces se inocularon en medio YPX (pH 6,5) y se incubaron durante la noche a 35 °C. Se recolectaron 2 gdcw de cada uno mediante centrifugación y se resuspendieron en 50 ml de extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, xilosa 50 g/l, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y CaCO<sub>3</sub> 7,5 g/l. Los matraces se pusieron en producción a 35 °C y agitación a 70 rpm. La cepa CD861 (ejemplo 8B) se cultiva de modo similar, para comparar el efecto de la reinserción de *KmXYL2*.

La cepa CD861 tiene una productividad volumétrica de 0,46 g/l-hr y una velocidad de consumo de xilosa de 1,47 g/l-hr. Los cinco transformantes XDH+ tienen una media de 70% de menor productividad y 65% de menor consumo de xilosa. Después de aproximadamente 48 horas, la cepa CD861 produjo etanol aproximadamente 14 g/l y xilitol aproximadamente 4,7 g/l, mientras que los cinco transformantes XDH+ produjeron etanol aproximadamente 2,8-6,3 g/l y xilitol 1,2-2,2 g/l. Todos los transformantes XDH+ menos uno dejaron de producir etanol después de aproximadamente 40 horas, aunque continuaron consumiendo xilosa de modo lineal pasadas 40 horas.

Las células tomadas al comienzo de la producción y después de 67 horas de producción se lisaron y se realizó la cuantificación de las proteínas utilizando el reactivo Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton-EUU). Se preparó una disolución 10X añadiendo 2,355 ml de tampón fosfato de sodio 1 M (pH 7,0) a 5 mg de β-NADH (Sigma), finalizando con una concentración final de NADH de 1,5 mM. Se añade agua hasta un volumen de 950 μl (menos volumen de muestra). Entonces se añade el extracto sin células y se sigue la absorbancia a 340 nm durante varios minutos para determinar el fondo. Entonces se añaden 50 μl de xilulosa 0,4 M y se sigue la absorbancia a 340 nm para determinar la actividad XDH. La actividad XDH para los cinco transformantes XDH+ tomados al principio de la producción varía de 287-374 mU/mg. Después de 67 horas de producción, las actividades de XDH varían de 62-86 mU/mg. La actividad XDH para la cepa CD861 fue de 16 mU/mg al principio de la producción, y de 3 mU/mg después de 67 horas de producción.

#### **Ejemplo 12B: Deleción del gen *ScXKS1* de la cepa CD861 (ejemplo 8B) mediante la transformación con el plásmido pCM28 (ejemplo 3B, figura 12); evaluaciones con matraces de agitación de los transformantes resultantes**

El plásmido pCM28 se linealizó por separado con *NaeI* y *PvuII* y se transformó en la cepa CD861 utilizando métodos de electroporación convencionales. Las células se recuperaron en YPD durante 3 horas, seguido de un cultivo en placa en medio de exclusión Sc-Ura. Treinta y dos colonias se volvieron a sembrar en estrías sobre placas por duplicado. Se realizó con ellas una selección con PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:122 y SEC ID NO:123 para amplificar la región codificadora del gen *ScXKS1*. Se inocularon 6 colonias que no produjeron la banda (esto indica la ausencia del gen *ScXKS1*) durante la noche en YPD para permitir la formación de un bucle en el gen *ScUra3*, y se cultivaron en placas FOA para seleccionar aquellas en las que se produjo el acontecimiento de formación de bucle. Las colonias que surgieron se volvieron a sembrar en estrías en YPD para seleccionar aislados de colonias individuales. Un aislado de cada transformación se seleccionó utilizando los anteriores cebadores, y también para la presencia de los genes *PXYLA*, *KmXYL1* y *KmXYL2*. Se realizó otra selección con PCR para seleccionar un acontecimiento de doble entrecruzamiento, en el que el módulo de *ScXKS1* se reemplaza por el módulo de *PXYLA* del plásmido pCM28. Los seis aislados fueron positivos para *PXYLA* y negativos para los genes *KmXYL1*, *KmXYL2* y *ScXKS1*. Uno de estos se denominó CD1065 y se utilizó en la evaluación con matraces de agitación.

Las cepas CD1065 y CD861 se inocularon por separado en matraces de agitación de 250 ml que contenían 50 ml de YPD, y se incubaron durante la noche a 37 °C y 250 rpm. Las células se recolectaron y se inocularon 4 gdcw en 50 ml de YPX. El matraz se incubó a 35 °C y se agitó a 70 rpm. Se extrajeron muestras cada cierto tiempo para controlar la actividad de fermentación. La cepa CD1065 muestra un retraso de 10-20 horas durante el cual consume xilosa muy lentamente. Esto se atribuye a la represión por glucosa de los genes de xiluloquinasa nativos. Después



de este periodo de inducción, la velocidad de consumo de xilosa aumenta, y la cepa CD1065 produce etanol aproximadamente 13 g/l después de 65 horas. La cepa CD861 produce etanol con mucha más rapidez, produciendo etanol aproximadamente 18 g/l después de aproximadamente 20 horas. La cepa CD1065 produce xilulosa aproximadamente 3,7 g/l después de aproximadamente 20 horas, pero la concentración de xilulosa disminuye después gradualmente. La actividad xiluloquinasa es de aproximadamente 0 para la cepa CD1065 y de aproximadamente 417 mU/mg para la cepa CD861. Las velocidades de consumo de xilosa para la cepa CD861 son aproximadamente el doble que las de la cepa CD1065. La actividad xilosa isomerasa es de aproximadamente 0,96 U/mg para la cepa CD1064, y de aproximadamente 1,79 U/mg para la cepa CD861. Estos resultados indican que la sobreexpresión de la xiluloquinasa mejora significativamente las velocidades de utilización de xilosa y de producción de etanol bajo estas condiciones.

Se retiraron células de las cepas CD861 y CD1065 tras la fase de producción, se sembraron en estrías en placas de YPX y se colocaron en un frasco anaerobio. Ambas crecieron de una manera comparable.

**Ejemplo 12C: Reinserción del gen *KmXYL1* en la cepa CD861 (ejemplo 8B) mediante la transformación con el plásmido pCM55 (figura 26); evaluaciones con matraces de agitación de los transformantes resultantes**

El gen *KmXYL1*, junto con 890 pb del flanco 5' y 414 pb del flanco 3', se amplificó a partir de ADN genómico de una cepa de *K. marxianus* de tipo salvaje, utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:124 y SEC ID NO:125. Estos cebadores introducen sitios de restricción *SacII*. El producto resultante de la PCR se digirió con *SacII* y se acopló a un plásmido tratado con fosfatasa alcalina de camarón digerido de modo similar pVR113 (ejemplo 10A, figura 22). El plásmido resultante se denominó pCM55 (figura 26). Se utilizaron los cebadores identificados como SEC ID NO:118 y SEC ID NO:126 para seleccionar el plásmido pCM55, y se empleó un cartografiado de restricción con *BstBI* y *SbfI* para confirmar la orientación. El gen *KmXYL1* amplificado se secuenció y se descubrió que contenía tres errores, uno de los cuales es silencioso y los otros provocan cambios de los aminoácidos 71V→A, 112Y→H y 302I→V.

El plásmido pCM55 se digirió con *PvuII* y se transformó en la cepa CD861 (ejemplo 8B) utilizando métodos de electroporación convencionales. Los transformantes se cultivaron en placas Sc-Ura y se incubaron a 37 °C. Se utilizaron los cebadores identificados como SEC ID NO:127 y SEC ID NO:128 para amplificar la región codificadora del gen *KmXYL1*, y se emplearon los cebadores identificados como SEC ID NO:121 y SEC ID NO:129 para amplificar la región que contiene el gen *ScUra3* a través del flanco 3' y hacia la región codificadora del gen *KmXYL1*. Seis transformantes positivos para ambas bandas (transformantes XR+) se utilizaron para el análisis con matraces de agitación.

Se obtuvieron aislados de cada uno de los cinco transformantes XR+ volviendo a sembrar en estrías desde medio mínimo a YPD. Los aislados entonces se volvieron a sembrar en estrías en YPX + G418 300 µg/ml + higromicina 300 µg/ml antes de la inoculación en medio YPX. Estos transformantes entonces se inocularon en medio que contenía extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, xilosa 50 g/l (pH 6,5), y se incubaron a 35 °C durante 48 horas. Se recolectó 1 gdcw de cada uno mediante centrifugación y se resuspendieron en 50 ml de extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, xilosa 50 g/l, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y CaCO<sub>3</sub> 7,5 g/l. Los matraces se pusieron en producción a 35 °C y agitación a 70 rpm. La cepa CD861 (ejemplo 8B) se cultiva de modo similar, utilizando 2 gdcw, para comparar el efecto de la reinserción de *KmXYL1*.

La cepa CD861 tiene una productividad volumétrica de 0,79 g/l-hr y una velocidad de consumo de xilosa de 2,02 g/l-hr (basándose en 2 gdcw). Cinco transformantes XR+ muestran un retraso de aproximadamente 20-50 horas, y después mostraron unas productividades volumétricas que varían de 0,05-0,13 g/l-hr y unas velocidades de consumo de xilosa de 0,45-0,67g/l-hr. Los rendimientos de etanol de estos cinco transformantes XR+ fueron de 18-33%, comparado con 51% para la cepa CD861.

Las células tomadas al comienzo de la producción y después de 67 horas de producción se lisaron y se realizó la cuantificación de las proteínas utilizando el reactivo Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton-EUUU). Se añadieron 100 µl de una dilución del extracto celular a una parte alícuota de 900 µl de una disolución de fosfato de sodio 100 mM, D-xilosa 0,5 M y NADPH 0,2 mM equilibrada a 37 °C. Se sigue la absorbancia para determinar la actividad *KmXYL1*. Cinco de las cepas XR+ tenían actividades XR en el intervalo de aproximadamente 34-86 mU/mg. La actividad *KmXYL1* de estos cinco transformantes XR+ mostró que los errores introducidos en el gen no destruían su actividad. La actividad *KmXYL1* de la cepa CD861 es aproximadamente 4 mU/mg.

El sexto transformante XR+ muestra una actividad *KmXYL1* de 19,5 mU/mg, mucho menor que los otros. Así, se parece a la cepa CD861 mucho más que los otros. Esta sexta cepa XR+ tiene una actuación similar a CD861 en el cultivo en matraz de agitación (después de un periodo de retraso inicial) y produce aproximadamente 13,8 g/l de etanol después de aproximadamente 51,5 horas.

Estos resultados demuestran que la actividad XR nativa tiene un efecto adverso sobre la capacidad de estas cepas para fermentar la xilosa a etanol bajo estas condiciones.

**Ejemplo 12D: Reinserción de los genes *KmXYX1* y *KmXYL2* en la cepa CD861 (ejemplo 8B) mediante la**

**transformación con el plásmido pCM58 (figura 27); evaluaciones con matraces de agitación de los transformantes resultantes**

Se construye un plásmido de la misma manera que se describe para el plásmido pCM52 (ejemplo 12A, figura 25), excepto que los flancos del gen *KmXYL2* están orientados en dirección opuesta a la del plásmido pCM52. Este plásmido se denomina pCM53. El gen *KmXYL2* en el plásmido pCM53 se secuenció y se descubre que contiene cuatro errores, tres de los cuales son silenciosos y el otro equivale a una mutación del aminoácido 260I→V.

El gen *KmXYL1*, junto con una región del flanco 5' y una región del flanco 3', se amplificó a partir de ADN genómico de una cepa de *K. marxianus* de tipo salvaje, utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:130 y SEC ID NO:131. Estos cebadores introducen sitios de restricción *SacI* y *NotI*. El producto resultante de la PCR se digirió con *SacII* y *NotI*, y se acopló a un plásmido digerido de modo similar pCM53. El plásmido resultante se denominó pCM58 (figura 27). Se utilizaron los cebadores identificados como SEC ID NO:66 y SEC ID NO:119 para seleccionar el plásmido pCM58, y se empleó un cartografiado de restricción con *Scal* y *XmnI* para confirmar la orientación. El gen *KmXYL1* amplificado se secuenció y se descubrió que contenía dos errores, uno de los cuales es silencioso y el otro provoca un cambio del aminoácido 71V→A.

El plásmido pCM58 se digirió con *PvuII* y se transformó en la cepa CD861 (ejemplo 8B) utilizando métodos de electroporación convencionales. Los transformantes se cultivaron en placas Sc-Ura y se incubaron a 37 °C. Se utilizaron los cebadores identificados como SEC ID NO:132 y SEC ID NO:133 para amplificar la región codificadora del gen *KmXYL1*, y se emplearon los cebadores identificados como SEC ID NO:134 y SEC ID NO:105 para amplificar la región que contiene el gen *KmXYL2* y los flancos. Cinco transformantes positivos para ambas bandas se utilizaron para su posterior análisis.

Los cinco transformantes seleccionados se inocularon en un medio líquido que contenía extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, xilosa 50 g/l (pH 6,5), y se incubaron a 35 °C durante 48 horas. Se recolectaron 4 gdcw de cada uno mediante centrifugación de cada uno y se resuspendieron en 50 ml de extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, xilosa 50 g/l, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y CaCO<sub>3</sub> 7,5 g/l. Los matraces se pusieron en producción a 35 °C y agitación a 70 rpm. La cepa CD861 (ejemplo 8B) se cultiva de modo similar, para comparar el efecto de la reinserción de *KmXYL1* y *KmXYL2*.

La cepa CD861 consume fundamentalmente toda la xilosa en 30 horas, produciendo etanol 16,1 g/l en ese tiempo. El rendimiento de etanol para la cepa CD861 fue de 67%. Los cinco transformantes XR+, XDH+ consumían xilosa mucho más lentamente, y producen unos rendimientos medios de etanol de aproximadamente 16%. La cepa CD861 produce un rendimiento de xilitol del 10% pero los cinco transformantes tienen una media de rendimiento de xilitol del 56%. La actividad xilosa reductasa para la cepa CD861 fue de aproximadamente 2 mU/mg, mientras que varía de 126-425 mU/mg en los transformantes, después de 73,5 horas de cultivo. La actividad xilitol deshidrogenasa en la cepa CD861 fue de cero, pero varía de 21 a 98 mU/mg en los transformantes después de 73,5 horas de cultivo. El aumento en las actividades de estas enzimas indica que los genes *KmXYL1* y *KmXYL2* reinsertados son funcionales en los cinco transformantes. La actividad xilosa isomerasa fue mayor en la cepa CD861 (aproximadamente 131 mU/mg) que en los cinco transformantes (aproximadamente 26-45 mU/mg). Sin embargo, el xilitol que estaba presente puede haber inhibido la actividad xilosa isomerasa en los cinco transformantes XR+, XDH+, dando como resultado un valor artificialmente bajo.

Estos datos también indican que la delección o la alteración de la vía de la aldosa reductasa/xilitol deshidrogenasa es beneficiosa en las cepas que tienen un gen de xilosa isomerasa exógeno, bajo estas condiciones de fermentación.

**Ejemplo 13A: Construcción del plásmido dirigido a XDH pMI410 (figura 29) para la transformación de *Candida sonorensis***

Se obtuvo el ADN genómico de *C. sonorensis* (ATCC n° de registro 32109) según se describe en el documento WO 03/049525.

Una porción del banco lambda de *C. sonorensis* descrito en el documento WO 03/049525 se seleccionó utilizando el gen XYL2 de *Pichia stipitis* (Kötter *et al.*, 1990, Curr. Genet., 18:493-500) como sonda. El gen XYL2 se marcó con <sup>32</sup>P-dCTP utilizando el kit de marcaje de cebado aleatorio (Boehringer Mannheim). La hibridación se realizó mediante una incubación durante la noche a 55 °C en una disolución que contenía 6x SSC, 5x disolución de Denhardt, SDS al 0,5%, ADN de esperma de arenque desnaturalizado 100 g/ml. Los filtros se lavaron después de la hibridación a temperatura ambiente en una disolución de 2x SSC durante 5 min y se repitió, seguido de un lavado a 55 °C en 2x SSC-SDS al 0,1% durante 30 minutos. Esto produjo el aislamiento de los clones de hibridación que contenían el gen de la xilitol deshidrogenasa de *C. sonorensis* (*CsXDH*).

La región 5' del gen *CsXDH* se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:135 y SEC ID NO:136, y se empleó el gen *CsXDH* como molde. El producto de la PCR se cortó con *SacI* y *SalI* para producir un fragmento de 642 pb que se aisló en gel.

El plásmido pMI281 se preparó cortando el plásmido pMI278 (descrito en la figura 14 del documento WO 03/049525)

con *Xba*I, y circularizando el fragmento de 4976 pb obtenido. El anterior fragmento de 642 pb se acopló a un fragmento de 4965 pb obtenido digiriendo el plásmido pMI281 con *Sac*I y *Sal*I. El plásmido resultante se denominó pMI409 (figura 28).

5 La región 3' del gen *CsXDH* se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:137 y SEC ID NO:138, y el mismo clon del banco lambda como molde. El producto de la PCR se cortó con *Not*I y *Ap*aI. Un fragmento de 457 pb se aisló en gel y se acopló a un fragmento de 5551 pb obtenido digiriendo el plásmido pMI409 con *Not*I y *Ap*aI. El plásmido resultante se denominó pMI410 (figura 29).

**Ejemplo 13B: Construcción del plásmido dirigido a XR pMI412 (figura 31) para la transformación de *C. sonorensis***

10 Un homólogo de secuencia de la xilosa reductasa se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos identificados como SEC ID NO:139 y SEC ID NO:140, y ADN genómico de *C. sonorensis* como molde. Los oligonucleótidos se diseñaron basándose en las secuencias conservadas que se encuentran en secuencias fúngicas conocidas de xilosa reductasa y aldosa reductasa. El producto de la PCR de 700 pb se marcó y se utilizó como sonda para el aislamiento de clones lambda *CsXR* genómicos del banco genómico de modo similar al descrito en el documento WO 03/049525.

15 La región 5' del gen de la xilosa reductasa de *C. sonorensis* (*CsXR*) se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:141 y SEC ID NO:142. Se empleó como molde una porción del clon del banco lambda de *C. sonorensis* descrito en el documento WO 03/049525 que contiene el gen *CsXR*. El producto de la PCR se cortó con *Sac*I y *Sal*I. Un fragmento de 526 pb se aisló en gel y se acopló a un fragmento de 4965 pb obtenido digiriendo el plásmido pMI281 con *Sac*I y *Sal*I. El plásmido resultante se denominó pMI411 (figura 30).

20 La región 3' del gen *CsXR* se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:143 y SEC ID NO:144, y el mismo clon del banco lambda como molde. El producto de la PCR se cortó con *Not*I y *Ap*aI. Un fragmento de 591 pb se aisló en gel y se acopló a un fragmento de 5435 pb obtenido digiriendo el plásmido pMI411 con *Not*I y *Ap*aI. El plásmido resultante se denominó pMI412 (figura 31).

25 **Ejemplo 13C: Construcción del plásmido de expresión de *PXYLA* pMI417 (figura 33) para la inserción simultánea de *PXYLA* y la delección de *CsXR* en *C. sonorensis***

30 El gen *PXYLA* desde ATG hasta el sitio único *Age*I se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:145 y SEC ID NO:146, y pCM29 (ejemplo 8A, figura 21) como molde. El producto de la PCR se cortó con *Age*I y *Kpn*I, y se aisló en gel un fragmento de 453 pb. El plásmido pCM29 se cortó con *Age*I. Un fragmento de 8151 pb se aisló en gel y se digirió parcialmente con *Kpn*I. El fragmento de 6501 pb resultante se aisló en gel y se acopló al fragmento de la PCR de 453 pb. El plásmido se denominó pMI400.

35 El plásmido pMI278 se cortó con *Bam*HI, se rellenó con la enzima Klenow y se digirió parcialmente con *Xba*I. El fragmento de 6675 pb resultante se aisló en gel. El plásmido pMI400 se cortó con *Sbf*I, se formaron extremos romos con T4 polimerasa, y se cortó con *Xba*I. El fragmento de 1358 pb resultante se aisló en gel y se acopló al fragmento de 6675 pb de pMI278 para formar el plásmido pMI403 (figura 32).

40 El plásmido pMI412 (ejemplo 13B, figura 31) se cortó con *Sal*I y *Not*I. Se aisló un fragmento de 4037 pb y se acopló con un fragmento de 5042 pb obtenido digiriendo pMI403 con *Sal*I y *Not*I. El plásmido resultante se denominó pMI417 (figura 33). El plásmido pMI417 contiene el gen *PXYLA* y un gen marcador de G418 con regiones promotoras y terminadoras asociadas entre las regiones cadena arriba y cadena abajo del gen *CsXR*. El gen *PXYLA* está bajo el control del promotor de *PGK* de *C. sonorensis* y del terminador *ScGAL10*.

**Ejemplo 13D: Construcción del plásmido de expresión de *ScXKS1* pMI425 (figura 34) para la inserción simultánea de *ScXKS1* y la delección de *CsXDH* en la transformación de *C. sonorensis***

45 La región 5' de *ScXKS1* desde ATG hasta el único sitio *Bgl*II se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:147 y SEC ID NO:148, y pVR103 (ejemplo 5C, figura 18) como molde. El producto de la PCR se cortó con *Not*I y *Bgl*II, y se aisló en gel un fragmento de 267 pb. El plásmido pVR103 (ejemplo 5C, figura 18) se cortó con *Not*I y *Bgl*II. Se obtuvo un fragmento de 4633 pb y se acopló al fragmento de PCR de 267 pb. El plásmido se denominó pMI406.

50 El plásmido pMI403 (ejemplo 13C, figura 32) se cortó con *Eco*NI, se rellenó utilizando la enzima Klenow y se cortó con *Sal*I. Se aisló en gel un fragmento de 6505 pb. El plásmido pMI271 (descrito en la figura 7 del documento WO 03/049525) se cortó con *Bam*HI, se rellenó utilizando la enzima Klenow y se cortó con *Sal*I. El fragmento de 1666 pb resultante se aisló en gel y se acopló al fragmento de 6505 pb. El plásmido resultante se denomina pMI423.

55 El plásmido pMI410 (ejemplo 13A, figura 29) y el plásmido pMI406 se digirieron cada uno con *Xba*I, se desfosforilaron utilizando fosfatasa alcalina intestinal de ternera, y se cortaron con *Bam*HI. Se aislaron en gel fragmentos de 5032 pb y 1814 pb. El plásmido pMI423 se digirió con *Xba*I, y el fragmento de 2817 pb resultante se aisló en gel. Los tres fragmentos se acoplaron y el plásmido resultante se denominó pMI425 (figura 34). El plásmido

pMI425 contiene una porción de la región promotora del gen *CsXDH*, un gen *hph* con regiones promotoras y terminadoras asociadas, el gen *ScXKS1* bajo el control de un promotor de PGK de *C. sonorensis* y de un terminador *ScGAL10*, seguido de una porción de la región terminadora para el gen *CsXDH*.

5 **Ejemplo 13E: Generación de cepas mutantes de *C. sonorensis* (Cs/T-1, Cs/T-25, SC/T-34 y Cs/T-51) que contienen los genes reconstruidos *PXYLA* y *ScXKS1***

Los plásmidos pMI417 (ejemplo 13C, figura 33) y pMI425 (ejemplo 13D, figura 34) se emplean para transformar una colonia de *C. sonorensis* utilizando métodos químicos similares a los descritos en el documento WO 03/049525. Las células transformadas se cultivan en YPD + G418 200 µg/ml o YPD + higromicina 200 µg/ml y G418 200 µg/ml. Un análisis con sondas de *PXYLA* y *ScXKS1* confirma la presencia de cepas como sigue:

- 10 - Cepa Cs/T-1: 1 copia de *PXYLA* y 1 copia de *ScXKS1*  
 - Cepa Cs/T-25: 1 copia de *PXYLA* y 2 copias de *ScXKS1*  
 - Cepa Cs/T-51: 2 copias de *PXYLA* y 1 copia de *ScXKS1*  
 - Cepa Cs/T-34: 2 copias de *PXYLA* y 2 copias de *ScXKS1*

15 **Ejemplo 13F: Generación de cepas mutantes de *C. sonorensis* (Cs/417-201, -206, -208 y -214) que contienen el gen *PXYLA* reconstruido con y sin una delección del gen *CsXR* mediante una transformación con el plásmido pMI417 (ejemplo 13C, figura 33)**

20 El plásmido pMI417 se digiere con *SacI* y *Apal* y se utiliza para transformar una colonia de *C. sonorensis* utilizando métodos químicos similares a los descritos en el documento WO 03/049525. Las células transformadas se cultivaron en YPD + G418 200 µg/ml. Un análisis de PCR identifica a las colonias que tienen el gen *PXYLA* y la delección de *CsXR*. Un análisis de la transferencia Southern confirma que la cepa denominada Cs/417-206 contiene una copia del gen *PXYLA*, mientras que la cepa denominada Cs/417-214 contiene dos copias del gen *PXYLAK*, además de la delección de *CsXR*. La cepa Cs/417-201 contiene dos copias del gen *PXYLA* pero no la delección de *CsXR*. La cepa Cs/417-208 contiene una única copia del gen *PXYLA* y no tiene la delección de *CsXR*.

25 **Ejemplo 13G: Generación de cepas mutantes de *C. sonorensis* (Cs/417-214/425A y Cs/417-214/425B) que contienen el gen *PXYLA* reconstruido, un gen *ScXKS1*, una delección del *CsXR*, y con (A) y sin (B) la delección del gen *CsXDH*, mediante la transformación de Cs/417-214 (ejemplo 13F) con el plásmido pMI425 (ejemplo 13D, figura 34)**

30 El plásmido pMI425 se digiere con *PmeI* y *PspOMI* y se utiliza para transformar la cepa Cs/417-214 utilizando métodos químicos similares a los descritos en el documento WO 03/049525. Las células transformadas se cultivaron en YPD + higromicina 200 µg/ml, o en YPD + higromicina 200 µg/ml + G418 200 µg/ml. Se emplea un análisis de PCR y de la transferencia Southern para identificar las colonias que contienen el gen *ScXKS1* y para determinar si se ha producido la delección del gen *CsXDH*. Una cepa que tiene dos copias del gen *PXYLA* reconstruido, una copia del gen *ScXKS1*, una delección del gen *CsXR*, y una delección del gen *CsXDH* se denomina Cs/417-214/425A. Una cepa que tiene dos copias del gen *PXYLA* reconstruido, una copia del gen *ScXKS1*, una delección del gen *CsXR* pero no tiene delección del gen *CsXDH* se denomina Cs/417-214/425B.

35 **Ejemplo 13H: Generación de una cepa mutante de *C. sonorensis* (C29/403-7) que contiene el gen *PXYLA* reconstruido y un gen de lactato deshidrogenasa (LDH) funcional mediante la transformación con el plásmido pMI403 (ejemplo 13C, figura 32)**

40 Se utilizó el plásmido pMI403 para transformar una cepa de *C. sonorensis* mutante que se corresponde con la identificada como cepa 246-27 en el documento WO 03/049525, utilizando métodos químicos similares a los descritos en él. La cepa 246-27 contiene un gen de lactato deshidrogenasa (LDH) exógeno funcional. Las células transformadas se cultivaron en YPD + G418 200 µg/ml. Una cepa que muestra actividad XI 70 mU/mg se denomina C29/403-7. Aparentemente contiene múltiples copias del gen *PXYLA*, bajo el control del promotor *CsPGK* y del terminador *ScGAL10*. Además, la cepa C29/403-7 contiene el gen de lactato deshidrogenasa funcional.

45 **Ejemplo 13I: Generación de una cepa mutante de *C. sonorensis* (C29/403-7/425) que contiene el gen *PXYLA* reconstruido, el gen *ScXKS1* y un gen LDH funcional, mediante la transformación de la cepa C29/403-7 (ejemplo 13H) con el plásmido pMI425 (ejemplo 13D, figura 34)**

50 El plásmido pMI425 se digirió con *SalI* y *NotI* y se empleó para transformar la cepa C29/403-7 (ejemplo 13H) utilizando métodos químicos similares a los descritos en el documento WO 03/049525. Las células transformadas se se cultivaron en YPD + higromicina 200 µg/ml, y en YPD + higromicina 200 µg/ml + G418 200 µg/ml. Se emplea un análisis de PCR y de la transferencia Southern para identificar los transformantes que contienen los genes *PXYLA* y *ScXKS1*, que se denominan colectivamente C29/403-7/425. La cepa C29/403-7/425 contiene el gen de la lactato deshidrogenasa funcional.

**Ejemplo 13J: Generación de cepas mutantes de *C. sonorensis* (C29/417-4 y C29/417-9) que contiene el gen *PXYLA* reconstruido y una delección del gen *CsXR***

El plásmido pMI417 (figura 13C, figura 33) se digiere con *SacI* y *Apal* y se emplea para transformar una cepa mutante de *C. sonorensis* que se corresponde con la identificada como la cepa 246-27 en el documento WO 03/049525, utilizando métodos químicos similares a los descritos en él. Las células transformadas se cultivaron en YPD + G418 200 µg/ml. Un análisis de PCR identifica a las colonias que tienen el gen *PXYLA* y la delección de *CsXR*. Un análisis de la transferencia Southern confirma que una cepa mutante denominada C29/417-9 contiene una copia del gen *PXYLA*, y una cepa mutante denominada C29/417-9 contiene dos copias del gen *PXYLA*, además de la delección de *CsXR*.

**Ejemplo 13K: Generación de cepas mutantes de *C. sonorensis* que contienen el gen *PXYLA* reconstruido, el gen *ScXKS1*, un gen *LDH*, una delección del gen *CsXR* y con (C29/417-9/425-11) y sin (C29/417-9/425-9) la delección del gen *CsXDH*, mediante la transformación de la cepa C29/417-9 (ejemplo 13J) con el plásmido pMI425 (ejemplo 13D, figura 34)**

El plásmido pMI425 se digirió con *PmeI* y *Apal* y se empleó para transformar la cepa C29/417-9 (ejemplo 13J) utilizando métodos químicos similares a los descritos en el documento WO 03/049525. Las células transformadas se cultivaron en YPD + higromicina 200 µg/ml. Un análisis de PCR identifica las colonias que tienen el gen *ScXKS1* y las que también contienen la delección de *CsXDH*. Los transformantes con y sin la delección de *CsXDH* se denominan C29/417-9/425-11 y C29/417-9/425-9, respectivamente.

**Ejemplo 14: Caracterización con matraces de agitación de las cepas de *C. sonorensis* de los ejemplos 13E-13K**

La siguiente tabla resume las cepas seleccionadas para las caracterizaciones con matraces de agitación, e indica las actividades xilosa isomerasa y xiluloquinasa.

Cepas que producen etanol

Denominación de la cepa	Ej. nº	XI <sup>1</sup>	XK <sup>2</sup>	XR <sup>3</sup>	XDH <sup>4</sup>	Actividad XI (mU/mg)	Actividad XK (mU/mg)
Cs/T-1	13E	1	1	+	+	170	840
Cs/T-25	13E	1	2	+	+	40	1060
Cs/T-34	13E	2	2	+	+	50	1600
Cs/T-51	13E	2	1	+	+	80	730
Cs/417-214	13F	2	0	-	+	70	70
Cs/417-206	13F	1	0	-	+	30	140
Cs/417-201	13F	2	0	+	+	60	100
Cs/417-208	13F	1	0	+	+	60	120
Cs/417-214/425A	13G	2	1	-	-	50	1440
Cs/417-214/425B	13G	2	1	-	+	50	860

Cepas que producen ácido láctico (todas contiene LDH exógeno)

Denominación de la cepa	Ej. nº	XI <sup>1</sup>	XK <sup>2</sup>	XR <sup>3</sup>	XDH <sup>4</sup>	Actividad XI (mU/mg)	Actividad XK (mU/mg)
C29/403-7	13H	2	0	+	+	90	N.D. <sup>5</sup>
C29/403-7/425	13I	2	1	+	+	90	N.D.
C29/417-4	13J	1	0	-	+	20	250
C29/417-9	13J	2	0	-	+	30	150
C29/417-9/425-11	13K	2	1	-	-	50	960

C29/417-9/425-9	13K	2	1	-	+	30	920
-----------------	-----	---	---	---	---	----	-----

Notas a las anteriores tablas: XI<sup>1</sup> = gen *PXYLA*; XK<sup>2</sup> = gen *ScXKS1*; XR<sup>3</sup> = gen de la xilosa reductasa nativo; XDH<sup>4</sup> = gen de la xilitol dehidrogenasa nativo. Los números indican el nº de copias integradas del gen. "+" indica que el gen nativo está intacto; "-" indica una delección del gen nativo. N.D.<sup>5</sup>: no determinado.

Se determinaron las actividades xiluloquinasa y xilosa isomerasa para estas muestras como sigue.

- 5 Las muestras (5-10 ml) se centrifugaron y se lavaron una vez con tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0. Después de lavar, las muestras se resuspendieron en reactivo de extracción de proteínas de levadura Y-PER (Pierce, Rockford, IL) que contenía inhibidores de proteasas (Complete Mini, sin EDTA, Roche). Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, las células se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a +4 °C. Se recogieron muestras de sobrenadante para la medición de las actividades.
- 10 Se determinó la actividad xiluloquinasa mediante un protocolo en dos etapas. En la etapa 1, la reacción contenía HEPES 50 mM/KOH, pH 7,5, ATP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, y xilulosa 20 mM. La reacción de fondo se determinó añadiendo agua en lugar de xilosa. Después de añadir la muestra de enzima, las reacciones se incubaron a 30 °C durante 0 y 240 segundos. Después de la incubación, las reacciones se detuvieron mediante su incubación a 95 °C durante 5 min. Después de que la reacción se detuviese se añadió HEPES 40 mM/KOH, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PEP 2,5 mM, y NADH 0,2 mM a la reacción y se midió la absorbancia a 340 nm. Después de medir la absorbancia inicial se añadió una mezcla de mioquinasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa. Esta reacción se incubó durante 1 hora más y se midió la absorbancia 340 nm. La actividad xiluloquinasa se calculó a partir de la producción de ADP durante los ensayos.
- 15 Se determinó la actividad xilosa isomerasa controlando la oxidación del NADH a 340 nm a 30 °C. La reacción contiene (además de la muestra) TES 100 mM-NaOH, pH 7,0, xilosa 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NADH 0,6 mM, y sorbitol deshidrogenasa 2,5 U. El fondo se detectó midiendo la actividad sin xilosa. El ensayo de xilosa isomerasa se realizó en un analizador automático Cobas Mira (Roche).
- 20 Se determinaron las concentraciones de proteínas con el método de Lowry (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193:265-275). Se empleó albúmina de suero bovino (Sigma) como patrón de proteínas.
- 25

**Ejemplo 14A: Caracterizaciones con matraces de agitación microaerobios de *C. sonorensis* de tipo salvaje y de las cepas Cs/T-1, -25, -34, -51 (ejemplo 13E), Cs/417-201, -206, -208, -214 (ejemplo 13F), y Cs/417-214/425A y -B (ejemplo 13G)**

- 30 Se inocularon 50 ml de YP (extracto de levadura 10 g/l y peptona 20 g/l) + glucosa al 5% + MgCl<sub>2</sub> 10 mM en matraces de 250 ml con células cultivadas en placas de YPD y se incubó durante la noche a 250 rpm agitando a 30 °C. Se retiró una parte alícuota de 5 ml para los ensayos de XI, XK y proteínas. Se midió la DO<sub>600</sub> y se recogió una cantidad de células equivalente a DO<sub>600</sub> = 12 (que corresponde a 4 g/l de peso seco celular) (DO<sub>600</sub> = 40 para las cepas Cs/417-214/425A y -B) en 50 ml mediante centrifugación, y se resuspendió en 50 ml de YP + xilosa al 5% + MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Las células resuspendidas se trasladaron a un matraz de 250 ml que contenía 1,2 g de CaCO<sub>3</sub>. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación a 100 rpm. Se recogieron a diario muestras para HPLC (para medir el consumo de xilosa, y la producción de etanol, xilitol, acetato y xilulosa) y mediciones de DO<sub>600</sub>. La fermentación se realizó a aproximadamente 11 días.
- 35

- 40 Las cepas Cs/T-1, -25, -34, -51 y Cs/417-214/425A y -B producen etanol 2-5 g/l, siendo el xilitol el principal producto para estas cepas. La cepa de *C. sonorensis* de tipo salvaje y las cepas Cs/417-201, -206, -208 y -214 no produjeron etanol bajo condiciones microaerobias. Esto indica que tanto la xilosa isomerasa como la xiluloquinasa son necesarias para la producción de etanol bajo condiciones microaerobias. Todas las cepas XR+ también producen acetato.

- 45 Las cepas Cs/417-201, -206, -208, -214, y Cs/417-214/425B consumen xilosa lentamente y no se produjo etanol, xilitol ni acetato bajo estas condiciones microaerobias. La cepa Cs/417-201/425A también consume xilosa lentamente y produce algo de xilitol. En el día 11, las cepas Cs/417-206 y Cs/417-214 producen 0,7 y 1,2 g/l de xilulosa, respectivamente. Esto sugiere que bajo estas condiciones microaerobias la xilulosa se acumula en las cepas XI+ que no tenían sobreexpresión de XK, y que la cantidad de acumulación de xilulosa depende del nivel de actividad XI.

- 50 **Ejemplo 14B: Caracterizaciones con matraces de agitación anaerobios de *C. sonorensis* de tipo salvaje y de las cepas Cs/T-25, -34 (ejemplo 13E), Cs/417-201, -214 (ejemplo 13F), y Cs/417-214/425A y -B (ejemplo 13G)**

Se inocularon 50 ml de YP + glucosa al 5% + MgCl<sub>2</sub> 10 mM en matraces de 250 ml con células cultivadas en placas de YPD y se incubó durante la noche a 250 rpm agitando a 30 °C. Se retiró una parte alícuota de 5 ml para los ensayos de XI, XK y proteínas. Se midió la DO<sub>600</sub> y se recogió una cantidad de células equivalente a DO<sub>600</sub> = 12 (que corresponde a 4 g/l de peso seco celular) (DO<sub>600</sub> = 40 para las cepas Cs/417-214/425A y -B) en 50 ml mediante

centrifugación, y se resuspendió en 50 ml de YP + xilosa al 5% + MgCl<sub>2</sub> 10 mM + CaCO<sub>3</sub> 24 g/l. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación a 100 rpm en matraces de agitación de 100 ml sellados con sellos para agua. Se tomaron muestras del cultivo. Se recogieron muestras periódicamente para HPLC (para medir el consumo de xilosa, y la producción de etanol, xilitol, acetato y xilulosa) y mediciones de DO<sub>600</sub>. El cultivo continuó durante 15 días.

5 Las cepas Cs/T-25 y -34 producen etanol 2 g/l durante los primeros 8 días de incubación, mientras que la cepa de *C. sonorensis* de tipo salvaje no produce etanol detectable. Las cepas Cs/417-201 y -214 tampoco produjeron etanol bajo estas condiciones, lo cual indica que son necesarios ambos genes de xilosa isomerasa y xiluloquinasa para obtener la capacidad de fermentación anaerobia sobre la xilosa en estas cepas.

10 La cepa Cs/417-214/425A produce etanol aproximadamente 13 g/l después de 4 días, y etanol aproximadamente 25 g/l después de 11 días. El rendimiento de xilosa a etanol fue de aproximadamente 55% después de 4 días, y de 53% después de 11 días. El consumo de xilosa fue de 22-23 g/l después de 4 días y de 48-49 g/l después de 11 días. La cepa Cs/417-214/425B consume aproximadamente 16 g/l de xilosa en 4 días y produce etanol 7 g/l. Esto indica que en estas cepas, la alteración de la vía de XR/XDH nativa, combinado con la sobreexpresión de XK y la expresión del gen XI exógeno, es importante para lograr una buena producción de etanol. Se observa que la alteración de ambos genes *CsXR* y *CsXDH* proporciona la mejor producción de etanol bajo condiciones anaerobias.

**Ejemplo 14C: Caracterizaciones con matraces de agitación microaerobios de la cepa mutante de *C. sonorensis* que produce LDH 246-27 y de las cepas C29/403-7 (ejemplo 13H) y C29/403-7/425 (ejemplo 13I)**

Se realizaron cultivos en matraces de agitación microaerobios para cada una de estas tres cepas, utilizando las condiciones generales descritas en el ejemplo 14A, excepto que también se controló la producción de lactato.

20 Bajo estas condiciones microaerobias, la cepa 246-27 y la cepa C29/403-7 consumen xilosa a aproximadamente 0,5 g/l/hr y todas produjeron ácido láctico a aproximadamente 0,4 g/l/hr. La cepa C29/403-7/425 produjo aproximadamente 10-15% más ácido láctico y aproximadamente 10-15% menos de xilitol que la cepa C29/403-7 bajo estas condiciones. La cepa C29/403-7 produce más xilulosa que las otras, lo cual sugiere que la xilulosa se acumula en esta cepa debido a la actividad xilosa isomerasa.

25 Al final de los cultivos, se siembran en estrías células de cada matraz en placas de YP + xilosa y de YP + glucosa, y se incuban en frascos anaerobios durante 9 días. Ninguna creció de modo anaerobio, pero todas crecieron de modo aerobio en medio de xilosa y glucosa.

**Ejemplo 14D: Caracterizaciones con matraces de agitación anaerobios de la cepa mutante de *C. sonorensis* productora de LDH 246-27 y de las cepas C29/403-7 (ejemplo 13H), C29/403-7/425 (ejemplo 13I) y C29/417-9 (ejemplo 13J)**

Se realizaron cultivos en matraces de agitación anaerobios para cada una de estas tres cepas, utilizando las condiciones generales descritas en el ejemplo 14B, excepto que también se controló la producción de lactato.

35 Todas las cepas consumían xilosa a una velocidad de aproximadamente 0,1 g/l/hr. Las cepas 246-7, C29/403-7, C29/403-7/425 y C29/417-9 producen 4,1, 4,8, 6,4 y 3,0 g/l de ácido láctico, 0,3, 0,45, 0,3 y 0,3 g/l de xilitol, y 0,3, 1,45, 0,9 y 0,85 g/l de xilulosa, respectivamente, después de 141 horas. Bajo estas condiciones, la sobreexpresión de la enzima xiluloquinasa conduce a una mejor producción de ácido láctico. Las cepas que sobreexpresan la xilosa isomerasa pero sin sobreexpresar la xiluloquinasa acumulan xilulosa, lo cual indica que el gen de la xilosa isomerasa es activo.

**Ejemplo 14E: Caracterizaciones con matraces de agitación microaerobios de la cepa mutante de *C. sonorensis* productora de LDH 246-27 y de las cepas C29/417-4 y -9 (ejemplo 13J), C29/417-9/425-9 y -11 (ejemplo 13K)**

Se realizaron cultivos en matraces de agitación microaerobios para cada una de estas tres cepas, utilizando las condiciones generales descritas en el ejemplo 14C. Los cultivos continuaron durante 7 días.

45 Bajo estas condiciones microaerobias, la cepa 246-27 consume xilosa con más rapidez que las otras cepas. Las cepas C29/417-4, C29/417-9/425-9 y -11 produjeron ácido láctico aproximadamente 2-5 g/l después de 7 días, tras lo cual siguió habiendo xilosa residual 25-35 g/l. La capacidad de la cepa C29/417-9/425-11 para producir ácido láctico confirma que la vía de la xilosa isomerasa y xiluloquinasa es operativa en estas cepas. La cepa C29/417-9/425-11 consume xilosa ligeramente más rápido que la cepa C29/417-9/425-9, pero también acumula xilitol 1-2 g/l.

**Ejemplo 14F: Caracterizaciones con matraces de agitación anaerobios de las cepas mutantes de *C. sonorensis* productoras de LDH C29/417-9 (ejemplo 13J), C29/417-9/245-9 y -11 (ejemplo 13K)**

Se realizaron cultivos en matraces de agitación anaerobios para cada una de estas tres cepas, utilizando las condiciones generales descritas en el ejemplo 14D.

Las cepas C29/417-9, C29/417-9/425-9 y C29/417-9/425-11 producen ácido láctico 4,4, 6,2 y 24,4 g/l después de

146 horas. El rendimiento de ácido láctico sobre la xilosa fue de 0,40, 0,70 y 0,95 g/g, respectivamente, para estas cepas. Las cepas C29/417-9/425-9 y -11 no produjeron xilitol, mientras que la cepa C29/417-9 produjo xilitol 2,7 g/l. Bajo estas condiciones, la sobreexpresión de la enzima xiluloquinasa conduce a una mejor producción de ácido láctico. Esto indica que, en estas cepas, la alteración de la vía de xilosa reductasa/xilitol deshidrogenasa nativa, combinado con la sobreexpresión de xiluloquinasa y xilosa isomerasa exógena, proporciona una buena producción de ácido láctico. Se demuestra que la alteración de ambos genes *CsXR* y *CsXDH* proporciona la mejor producción bajo condiciones anaerobias.

**Ejemplo 15A: Generación de cepas mutantes de *K. marxianus* (CD1103 y CD1106) que contiene el gen de la xilosa isomerasa de *Cyllumyces aberensis* (*CaXYLA*)**

El ADN de *Cyllumyces aberensis* (aislado ffew1 de vaca, Reino Unido) se obtuvo de Gareth Wyn Griffith, Institute of Biological Sciences, University of Wales, Aberystwyth, Ceredigion SY23 3DA, Gran Bretaña. Se realizaron reacciones de PCR utilizando este ADN como molde, utilizando 0,5 µM del cebador sentido identificado como SEC ID NO:149, y 0,5 µM del cebador antisentido identificado como SEC ID NO:150, tampón Phusion HF y 0,2 mM de cada dNTP. En esta construcción, la primera metionina codificada detectada en el extremo 5' de la secuencia del gen actúa como metionina de inicio, y se incluyó un codón de fin dentro de marco además de sitios de restricción *SbfI*. Antes de una desnaturalización de 3 minutos se añadieron 2 U de polimerasa Phusion (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia). La reacción se cicló 35 veces como sigue: 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 45 °C, y 1 minuto a 72 °C con una extensión final de 8 minutos a 72 °C. Se obtuvo un fragmento de PCR de 1346 pb y se acopló a un plásmido TOPO con el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenció. El gen de la xilosa isomerasa de *C. aberensis* (*CaXYLA*) tiene la secuencia de nucleótidos identificada como SEC ID NO:151. La secuencia de aminoácidos deducida para la proteína codificada por este gen se indica en SEC ID NO:152.

El ADN genómico de *K. marxianus* se obtuvo de una cepa de *K. marxianus* de tipo salvaje similar a la descrita anteriormente. Se aisló el gen *Ura3* de *K. marxianus* (*KmURA3*) más aproximadamente 750 pb de la región promotora de *Ura3* y aproximadamente 250 pb hacia la región del terminador de *Ura3* con un protocolo convencional utilizando la polimerasa Failsafe Polymerase (Epicenter), con el ADN genómico como molde y los cebadores identificados como SEC ID NO:153 y SEC ID NO:154. Las condiciones de la PCR fueron 5 minutos a 95 °C, 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, y 2 minutos a 68 °C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C y 2,5 minutos a 68 °C, terminando con un ciclo de generación de extremos romos de 68 °C durante 8 minutos. El producto resultante de la PCR de aproximadamente 1,8 kb se clonó en el vector pCR-XL-TOPO (Invitrogen) y se secuenció para su verificación. El plásmido resultante se denominó pSO90. La secuencia de nucleótidos del gen *KmURA3* clonado se indica como SEC ID NO:155. El plásmido pSO90 se digiere con *SphI* y la región de *KmURA3* de aproximadamente 1,8 kpb se aísla en gel y se acopla en un fragmento de aproximadamente 4570 pb tratado con fosfatasa alcalina de camarón y digerido de modo similar del plásmido pCM9 (ejemplo 11, figura 9). El plásmido resultante (pSO91, figura 35) contiene el gen de selección *KmURA3*, el promotor *KmPDC1*, un sitio *SbfI*, y el terminador *ScCYC1*.

El plásmido que contiene *CaXYLA* anterior se digirió y se aísla en gel un fragmento de aproximadamente 1,4 kpb que contiene el gen *CaXYLA*. El plásmido pSO91 se digirió de forma similar y se trató con fosfatasa alcalina de camarón para obtener un fragmento de 6376 pb. Estos fragmentos se acoplaron con ligasa de T4 HC (Invitrogen) para formar un plásmido (pSO99, figura 36) que contiene un gen de selección *KmURA3* y el gen *CaXYLA* bajo el control del promotor *KmPDC1*, y del terminador *ScCYC1*.

Se cultiva una colonia de *K. marxianus* que corresponde a CD806 (ejemplo 6B). Se sedimentan mediante centrifugación 20 ml de células y se transforman con el plásmido pSO99 utilizando métodos de electroporación convencionales, después de la digestión del plásmido con *AatII* y *BsmBI* (sin limpiar). Se cultivaron 100 µl de células sobre placas SC-Ura y se dejaron crecer a 37 °C hasta que se formaron colonias. Las colonias se sembraron en estrías sobre placas secundarias Sc-Ura, mostrando todas crecimiento. Los transformantes se seleccionaron mediante PCR para detectar la presencia del gen *KmURA3* intacto (insertado con el plásmido pSO19) con los cebadores identificados como SEC ID NO:156 y SEC ID NO:157, y también para una región interna del gen *CaXYLA* utilizando cebadores identificados como SEC ID NO:158 y SEC ID NO:159. CD1103 contiene el gen *CaXYLA*, un gen *KmURA3* intacto, y un gen *KmURA3* alterado. CD1106 contiene el gen *CaXYLA*, y el gen *KmURA3* alterado.

**Ejemplo 15B: Fermentación anaerobia con las cepas CD1103 y CD1106 (ejemplo 15A)**

Se inocularon por separado matraces de agitación amortiguados que contenían 100 ml de medio (extracto de levadura 20 g/l, peptona 10 g/l, glucosa 100 g/l) con las cepas CD1103 y CD1106 y se incubaron durante la noche a 35 °C y con agitación a 250 rpm. Las células se recolectaron después de aproximadamente 14 horas, y se añadieron 4 g/l en peso seco celular de cada cepa a distintos tubos con tapón roscado Falcon de 50 ml que contenían 45 ml de peptona de levadura, D-xilosa 50 g/l, CaCO<sub>3</sub> 7,5 g/l, y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Los tubos se cultivaron de modo anaerobio durante 65 horas a 30 °C con agitación a 70 rpm. La cepa CD1103 produce más de 9 g/l de etanol, y la cepa CD1106 produce más de 7 g/l de etanol en el mismo tiempo. Se determinó la actividad XI lisando las células tomadas de la fase de crecimiento. Se midió la actividad XI y se descubrió que era de aproximadamente 83 mU/mg para cada una de las cepas CD1130 y CD1106.



**Ejemplo 16A: Clonación del gen de la xilosa isomerasa de *B. thetaiotaomicron* (*BtXYLA*) (pSO89, figura 37)**

El ADN genómico de *Bacteroides thetaiotaomicron* se obtuvo de la Universidad de Washington (St. Louis, MO), Departamento de Biología Molecular y Farmacología. El gen *BtXYLA* se aisló con un protocolo convencional utilizando la polimerasa Pfx Polymerase (Stratagene), con el ADN genómico como molde y los cebadores identificados como SEC ID NO:160 y SEC ID NO:161. Las condiciones de la PCR fueron de 95 °C durante 3 minutos; 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, y 2 minutos a 68 °C, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, y 2,5 minutos a 68 °C, terminando con un ciclo de generación de extremos romos de 68 °C durante 8 minutos. El producto resultante de la PCR de aproximadamente 1,4 kb se clonó en el vector pCR-XL-TOPO (Invitrogen) y se secuenció para su verificación. El plásmido resultante se denominó pSO89 (figura 37). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del gen *BtXYLA* clonado aparecen en SEC ID NO:162 y SEC ID NO:163, respectivamente.

**Ejemplo 16B: Creación de un plásmido que contiene los genes de selección *BtXYLA* y *KmURA3* (pSO96, figura 38)**

El gen *BtXYLA* de aproximadamente 1,4 kb se extrajo en gel del plásmido pSO89 después de una digestión con *SbfI* y se acopló a un fragmento de 6376 pb digerido de modo similar del plásmido pSO91 (ejemplo 16A, figura 35). El plásmido resultante (pSO96, figura 38) contiene el gen de selección *KmURA3*, el gen *BtXYLA* bajo el control del promotor *KmPDC1* y del terminador *ScCYC1*.

**Ejemplo 16C: Creación de mutantes de *K. marxianus* (CD1089-1096) mediante la transformación de una cepa que corresponde a CD806 (ejemplo 6B) con el plásmido pSO96 (ejemplo 16B, figura 38)**

Se cultiva una colonia de *K. marxianus* que corresponde a CD806 (ejemplo 6B). Se sedimentan mediante centrifugación 20 ml de células y se transforman con el plásmido pSO96 utilizando métodos de electroporación convencionales. El plásmido pSO96 se digiere con *AatII* y *BsmBI* antes de la integración. Se cultivaron 100 µl de células en placas Sc-Ura y se dejaron crecer a 37 °C hasta que formaron colonias. Las colonias se sembraron en estrías en placas secundarias de SC-Ura. Los transformantes se seleccionaron mediante PCR para detectar la presencia del gen *KmURA3* intacto con los cebadores identificados como SEC ID NO:156 y SEC ID NO:157. Se realiza una selección con PCR para una región de aproximadamente 450 pb cadena arriba del codón de fin *BtXYLA* y justo dentro del terminador *ScCYC1* con los cebadores identificados como SEC ID NO:164 y SEC ID NO:165. De los transformantes positivos al gen *BtXYLA* y *KmURA3* nativo se seleccionaron ocho y se denominaron CD1089-1096, respectivamente.

Para la determinación de la actividad xilosa isomerasa, las cepas se cultivaron a 30 °C, a 250 rpm durante aproximadamente 14 horas en YPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, dextrosa 100 g/l). Las células se lisaron según el protocolo para Y-PER (Pierce n° 78990). Se determinó la proteína total utilizando el reactivo Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton n° ADV01) con BSA como patrón. La actividad de la enzima xilosa reductasa de las cepas CD806 y CD1089-1096 es la siguiente:

Cepa	Actividad XI (mU/mg)
CD806 (ejemplo 6B)	0
CD1089	143 ± 13
CD1090	48 ± 1
CD1091	41 ± 6
CD1092	108 ± 21
CD1093	45
CD1094	74 ± 29
CD1095	10 ± 13
CD1096	87 ± 34

Las mayores actividades de CD1089 y CD1092 pueden ser debidas a la integración de múltiples copias del gen *BtXYLA* o a un sitio preferido de integración.

**Ejemplo 16D: Caracterización con matraces de agitación de las cepas CD1089-1096 (ejemplo 16C)**

5 Se inocularon por separado colonias individuales de las cepas CD806 y CD1089-1096 para el crecimiento en 100 ml de medio que consistía en extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, y dextrosa 100 g/l. Las células se cultivaron durante 14 horas a 30 °C, tras lo cual las células se recogieron y se determinó el peso seco celular. Se añaden 1,4 g/l de peso seco celular de cada cultivo a distintos tubos Falcon de 50 ml que contienen extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, D-xilosa 50 g/l, CaCO<sub>3</sub> 7,5 g/l, y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Estos cultivos se incubaron a 30 °C con agitación a 70 rpm. Se tomaron muestras del caldo de cultivo para un análisis de HPLC aproximadamente cada 24 horas. Después de 72 horas, los resultados de esta fermentación anaerobia fueron como se muestra en la siguiente tabla:

Cepa	Xilosa consumida (g)	Etanol producido (g)	Xilitol producido (g)
CD806 (ejemplo 6B)	aprox. 2,5	aprox. 0,4	aprox. 0
CD1089	aprox. 19,6	aprox. 7,3	aprox. 1,45
CD1090	aprox. 10,7	aprox. 4,0	aprox. 0,9
CD1091	aprox. 11,0	aprox. 4,15	aprox. 0,9
CD1092	aprox. 16,55	aprox. 6,2	aprox. 1,1
CD1093	aprox. 7,5	aprox. 4,1	aprox. 0,9
CD1094	aprox. 9,6	aprox. 3,7	aprox. 0,9
CD1095	aprox. 1,7	0	0
CD1096	aprox. 9,45	aprox. 3,95	aprox. 0,9

10 En los estudios de fermentación con matraces de agitación microaerobios, las cepas CD1089 y CD1092 produjeron hasta aproximadamente 1 gramo de etanol después de aproximadamente 7 horas de fermentación a 30 °C y 70 rpm.

Las cepas CD1089-1096 se cultivaron en placas YPX al final de un cultivo con xilosa con bajo contenido en oxígeno y se colocaron en una cámara anaerobia durante dos días. Todas las cepas excepto CD1095 mostraron crecimiento anaerobio en estas condiciones, siendo las cepas CD1089 y CD1092 las que muestran el mayor crecimiento anaerobio.

15 **Ejemplo 17: Fermentación en matraces de agitación de las cepas CD804 (ejemplo 4D), CD805 (ejemplo 5E) y CD806 (ejemplo 6B) en medio con xilosa y una enzima glucosa isomerasa comercial añadida de modo externo**

20 Las cepas CD804, CD805 y CD806 se inocularon por separado a una DO<sub>600</sub> de 0,1 en placas de agar YPD y se cultivaron durante 16 horas a 33 °C con 250 rpm, en matraces de agitación amortiguados de 250 ml que contenían 50 ml de YPD suplementado con G418 50 µg/ml. Después de determinar que en cada matraz había glucosa residual y que por consiguiente las células estaban en la fase de crecimiento exponencial, se recolectaron equivalentes de 0,5 g/l de peso seco celular de cada cepa mediante centrifugación y se resuspendieron por separado en matraces de agitación amortiguados de 250 ml que contenían 47,5 ml de YP suplementado con D-xilosa 50 g/l. Se añadieron 2,5 ml de glucosa isomerasa (Gensweet SGI, Genencor Inc., CA) (también conocida como xilosa isomerasa) a los matraces de agitación y los cultivos se cultivaron a 33 °C con 70 rpm. Para los controles se resuspendieron por separado equivalentes de 0,5 g/l de peso seco celular de cada una de las cepas CD804, CD805 y CD806 en matraces de agitación amortiguados de 250 ml que contenían 50 ml de YP suplementado con D-xilosa 50 g/l sin glucosa isomerasa. Estos matraces de agitación también se incubaron a 33 °C con 70 rpm. Se extrajeron muestras a diversos intervalos de tiempo y las células se retiraron mediante filtración. El sobrenadante del cultivo se analizó para la xilosa, el xilitol y el etanol mediante métodos de HPLC.

30 Después de 25 horas, la cepa CD804 (ejemplo 4D) había consumido D-xilosa 15 g/l y había producido aproximadamente 4,7 g/l de xilitol y 1 g/l de etanol en el matraz que contenía la glucosa isomerasa. En contraste, las cepas CD805 (ejemplo 5C) y CD806 (ejemplo 6B) consumieron cada una D-xilosa 25 g/l en presencia de glucosa isomerasa. La cepa CD805 produjo en este tiempo aproximadamente 1,9 g/l de xilitol y 7,1 g/l de etanol. La cepa CD806 produjo en este tiempo aproximadamente 1,8 g/l de xilitol y 6,8 g/l de etanol. Parece que la xilulosa es consumida por las cepas a tasas muy altas, algo que no se observa en *S. cerevisiae*. La vía de pentosa fosfato no oxidativa controla la velocidad de fermentación de la xilulosa pero no de la xilosa en *S. cerevisiae* TMB3001 (FEM Yeast Res., agosto de 2002, 2(3):277-282, Johansson, B., Hahn-Hagerdal, B.). Sin la adición de glucosa isomerasa, las cepas CD804, CD805 y CD806 consumieron xilosa muy lentamente.

40 **Ejemplo 18: Transformación de la cepa que corresponde a CD806 (ejemplo 6B) con el plásmido autorreplicante pCM48 (figura 40) para introducir el gen *PXYLA*; cultivo de las cepas resultantes**

5 Un módulo que contenía el promotor *KmPDC1*, el gen *PXYLA* y el terminador *ScCYC1* se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores identificados como SEC ID NO:166 y SEC ID NO:167, utilizando el plásmido pCM29 (ejemplo 8A, figura 21) como molde. Estos cebadores se diseñaron para incorporar sitios de restricción *PacI* y *MluI*. Las condiciones de termociclado fueron una incubación inicial de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, y 70 °C durante 3 minutos. A esto le siguió una incubación final a 70 °C durante 8 minutos. El producto se digirió con las anteriores enzimas de restricción y el fragmento de 2,804 kpb obtenido se acopló a un fragmento obtenido digiriendo de forma similar un plásmido denominado pSO57 (figura 39) (que contiene un sitio de autorreplicación pKD1) para producir el plásmido pCM48 (figura 40). Se realizó un cartografiado de restricción de los transformantes utilizando *EcoRI* y *SbfI*, y se utilizaron los dos para la secuenciación. Se secuenció la región codificadora completa del gen *PXYLA* y se verificó que era idéntica en ambos transformantes que la secuencia en el plásmido pCM29.

15 Se transformaron 2 µg del plásmido sin digerir pCM48 en una cepa que corresponde a CD806 (ejemplo 6B) utilizando métodos de electroporación convencionales. Las células se recuperaron durante cuatros horas en YPX, se cultivaron en placas de YPX que contenían G418 300 µg/ml e higromicina 150 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante 2 días. Esto produjo un gran número de transformantes. Varios transformantes se volvieron a sembrar en estrías en placas idénticas y se incubaron a 37 °C durante varios días. Se seleccionaron cuatro transformantes y se inocularon en aproximadamente 100 ml de YPX en un matraz de agitación amortiguado de 250 ml y se incubaron a 37 °C con 250 rpm de agitación. Se incluyó la cepa CD861 y se preparó la biomasa de la misma manera. Después de 17 horas, se inocularon 2 gdcw de cada uno en distintos matraces de agitación amortiguados de 250 ml que contenían 50 ml de medio (extracto de levadura 10 g/l, peptona de levadura 20 g/l, xilosa 50 g/l, CaCO<sub>3</sub> 7,5 g/l, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y pH 7,0). Los cuatro transformantes produjeron aproximadamente 9-12,3 g/l de etanol después de aproximadamente 40 horas. La cepa de origen no produjo etanol.

20 Se recolectaron 10 ml del cultivo durante la noche mediante centrifugación y se llevaron a los ensayos enzimáticos. Las actividades xilosa isomerasa para los cuatro transformantes varían de 456 a 531 mU/mg.

25

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Cargill Dow LLC  
 RAJGARHIA, Vineet  
 MILLER, Chris  
 KOIVURANTA, Kari  
 OLSON, Stacey  
 PENTTILÄ, Merja  
 ILMÉN, Marja  
 10 SUOMINEN, Pirkko  
 ARISTIDOU, Aristos
- <120> Especies de levadura genéticamente modificadas, y procesos de fermentación que emplean levaduras genéticamente modificadas
- 15 <130> 1182A WO
- <150> documento US 60/467.727  
 <151> 02-05-2003
- 20 <160> 167
- <170> PatentIn versión 3.2
- 25 <210> 1  
 <211> 816  
 <212> ADN  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
- 30 <400> 1
- |   |            |
|---|------------|
| <b>atcgattaat ttttttttct ttcctctttt tattaacctt aatttttatt ttagattcct</b>  | <b>60</b>  |
| <b>gacttcaact caagacgcac agatattata acatctgcac aataggcatt tgcaagaatt</b>  | <b>120</b> |
| <b>actcgtgagt aaggaaagag tgaggaacta tcgcatacct gcattttaaag atgccgattt</b> | <b>180</b> |
| <b>gggcgcgaat cctttatttt ggcttcaccc tcatactatt atcagggcca gaaaaaggaa</b>  | <b>240</b> |
| <b>gtgtttccct ccttctttaa ttgatgttac cctcataaag cacgtggcct cttatcgaga</b>  | <b>300</b> |
| <b>aagaaattac cgtcgctcgt gatttgtttg caaaaagaac aaaactgaaa aaaccagac</b>   | <b>360</b> |
| <b>acgctcgact tcctgtcttc ctattgattg cagcttcaa tttcgtcaca caacaaggtc</b>   | <b>420</b> |
| <b>ctagcgacgg ctcacaggtt ttgtaacaag caatcgaagg ttctggaatg gcgggaaagg</b>  | <b>480</b> |
| <b>gtttagtacc acatgctatg atgcccactg tgatctccag agcaaagttc gttcgatcgt</b>  | <b>540</b> |
| <b>actgttactc tctctcttcc aacagaatt gtccgaatcg tgtgacaaca acagcctggt</b>   | <b>600</b> |
| <b>ctcacacact cttttcttct aaccaagggg gtggtttagt ttagtagaac ctcgtgaaac</b>  | <b>660</b> |
| <b>ttacatttac atatatataa acttgcataa attggtcaat gcaagaaata catatttggg</b>  | <b>720</b> |
| <b>cttttctaata tcgtagtttt tcaagttctt agatgctttc tttttctctt ttttacagat</b> | <b>780</b> |
| <b>catcaaggaa gtaattatct actttttaca acaaag</b>                            | <b>816</b> |
- 35 <210> 2  
 <211> 376  
 <212> ADN  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
- <400> 2

**gtagatacat tgatgctatc aatccagaga actggaaaga ttgtgtagcc ttgaaaaacg 60**  
**gtgaaactta cgggtccaag attgtctaca gattttcctg atttgccagc ttactatcct 120**  
**tcttgaaaat atgcactcta tatcttttag ttcttaattg caacacatag atttgctgta 180**  
**taacgaattt tatgctatth tttaaatttg gagttcagtg ataaaagtgt cacagcgaat 240**  
**ttcctcacat gtagggaccg aattgtttac aagttctctg taccaccatg gagacatcaa 300**  
**aaattgaaaa tctatggaaa gatatggacg gtagcaacaa gaatatagca cgagccgcgg 360**  
**atthatttcg ttacgc 376**

5 <210> 3  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> cebador de amplificación del gen PDC  
 <400> 3

15 **ccatcgataa caagctcatg caaagag 27**

20 <210> 4  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador de amplificación del gen PDC

25 <400> 4

**gctctagatt tgactgtgth atthtgcg 28**

30 <210> 5  
 <211> 1774  
 <212> ADN  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

35 <400> 5

aacaagctca tgcaaagagg tggtagccgc acgccgaaat gcatgcaagt aacctattca 60  
aagtaatatc tcatacatgt ttcattgaggg taacaacatg cgactggggtg agcatatggt 120  
ccgctgatgt gatgtgcaag ataaacaagc aaggcagaaa ctaacttctt ctcatgtaa 180  
taaacacacc ccgctgtttat ttacctatct ctaaacttca acaccttata tcataactaa 240  
tatttcttga gataagcaca ctgcacccat accttcctta aaaacgtagc ttccagtttt 300  
tggtaggttc ggcttccttc ccgattccgc ccgctaaacg catatttttg ttgcctgggtg 360  
gcatttgcaa aatgcataac ctatgcattt aaaagattat gtatgctctt ctgacttttc 420  
gtgtgatgag gctcgtggaa aaaatgaata atttatgaat ttgagaacaa ttttgtgttg 480  
ttacgggtatt ttactatgga ataataatc aattgaggat tttatgcaaa tatcgtttga 540  
atatttttcc gaccctttga gtacttttct tcataattgc ataataattgt ccgctgcccc 600  
tttttctggt agacgggtgc ttgatctact tgctatcgtt caacaccacc ttattttcta 660  
actatttttt ttttagctca tttgaatcag cttatgggtga tggcacattt ttgcataaac 720  
ctagctgtcc tcgttgaaca taggaaaaaa aaatatataa acaaggctct ttcactctcc 780  
  
ttgcaatcag atttgggttt gttcccttta tttcatatt tcttgtcata ttcctttctc 840  
aattattatt ttctactcat aacctcacgc aaaataacac agtcaaaaaac aagctcatgc 900  
aaagaggtgg taccgcacg ccgaaatgca tgcaagtaac ctattcaaag taatatctca 960  
tacatgtttc atgagggtaa caacatgca ctgggtgagc atatgttccg ctgatgtgat 1020  
gtgcaagata aacaagcaag gcagaaacta acttcttctt catgtaataa acacaccccg 1080  
cgtttattta cctatctcta aacttcaaca ctttatatca taactaatat ttcttgagat 1140  
aagcactg caccatacc ttccttaaaa acgtagcttc cagtttttg tggttccggc 1200  
ttccttcccg attccgcccg ctaaacgcat atttttgttg cctgggtggca tttgcaaaat 1260  
gcataaccta tgcatttaaa agattatgta tgctcttctg acttttcgtg tgatgaggct 1320  
cgtggaaaaa atgaataatt tatgaatttg agaacaattt tgtgttgta cggattttta 1380  
ctatggaata atcaatcaat tgaggatttt atgcaaatat cgtttgaata ttttccgac 1440  
cctttgagta ctttcttca taattgcata atattgtccg ctgcccctt tctgttaga 1500  
cgggtcttg atctacttg tctcgttcaa caccacctta ttttctaact atttttttt 1560  
tagctcattt gaatcagctt atgggtgatg cacatttttg cataaaccta gctgtcctcg 1620  
ttgaacatag gaaaaaaaaa tatataaaca aggctcttct actctccttg caatcagatt 1680  
tgggtttggt ccctttattt tcatatttct tgatcatatt ctttctcaat tattattttc 1740  
tactcataac ctcacgcaaa ataacacagt caaa 1774

<210> 6  
<211> 1235  
<212> ADN  
<213> artificial

5

<220>

<223> Fragmento de restricción con el promotor de PKG1 y el terminador GAL10

5 <400> 6

```

ggccgcggat cgctcttccg ctatcgatta attttttttt ctttcctctt tttattaacc      60
ttaattttta ttttagattc ctgacttcaa ctcaagacgc acagatatta taacatctgc      120
acaataggca tttgcaagaa ttactcgtga gtaaggaaag agtgaggaac tatcgcatac      180
ctgcatttaa agatgccgat ttgggcgcga atcctttatt ttggcttcac cctcatacta      240
ttatcagggc cagaaaaagg aagtgtttcc ctcttcttg aattgatggt accctcataa      300
agcacgtggc ctcttatcga gaaagaaatt accgtcgtc gtgatttggt tgcaaaaaga      360
acaaaactga aaaaaccag acacgctcga ctctctgtct tcctattgat tgcagcttcc      420
aatttcgtca cacaacaagg tcctagcgac ggctcacagg ttttgtaaca agcaatcgaa      480
ggttctggaa tggcgggaaa gggtttagta ccacatgcta tgatgccac tgtgatctcc      540
agagcaaagt tcgttcgatc gtactgttac tctctctctt tcaaacagaa ttgtccgaat      600
cgtgtgacaa caacagcctg ttctcacaca ctcttttctt ctaaccaagg gggtggttta      660
gttttagtaga acctcgtgaa acttacattt acatataat aaacttgcatt aaattgggtca      720

atgcaagaaa tacatatttg gtcttttcta attcgtagtt tttcaagttc ttagatgctt      780
tctttttctc ttttttacag atcatcaagg aagtaattat ctacttttta caacaaatct      840
agaattcggg tccggtagat acattgatgc tatcaatcaa gagaactgga aagatttgtgt      900
aaccttgaaa aacggtgaaa cttacgggtc caagaccctc tacagatttt cctgatttgc      960
cagcttacta tccttcttga aaatatgcac tctatatctt ttagttctta attgcaacac     1020
atagatttgc tgtataacga attttatgct attttttaa tttggagttc agtgataaaa     1080
gtgtcacagc gaatttcctc acatgtagga ccgaattggt tacaagttct ctgtaccacc     1140
atggagacat caaagattga aaatctatgg aaagataggg acggtagcaa caagaatata     1200
gcacgagccg cggatttatt tcgttacgca tgcgc                                     1235

```

10

<210> 7

<211> 1314

<212> ADN

15 <213> artificial

<220>

<223> Fragmento de restricción que contiene el promotor de PDC1 y el terminador GAL10

20

<400> 7

acaagttctc tgtaccacca tggagacatc aaaaattgaa aatctatgga aagatatgga 1260  
 cggtagcaac aagaatatag cacgagccgc ggatttattt cgttacgcat gcgc 1314  
 ggccgcggat cgctcttccg ctatcgataa caagctcatg caaagagggtg gtacccgcac 60  
 gccgaaatgc atgcaagtaa cctattcaaa gtaatatctc atacatgttt catgagggta 120  
 acaacatgcg actgggtgag catatgttcc gctgatgtga tgtgcaagat aaacaagcaa 180  
 ggcagaaact aacttcttct tcatgtaata aacacacccc gcgtttattt acctatctct 240  
 aaacttcaac accttatatc ataactaata tttcttgaga taagcacact gcaccatac 300  
 cttccttaaa aacgtagctt ccagtttttg gtggttccgg cttccttccc gattccgccc 360  
 gctaaacgca tatttttggt gcctgggtggc atttgcaaaa tgcataacct atgcatttaa 420  
 aagattatgt atgctcttct gacttttcgt gtgatgaggc tcgtggaaaa aatgaataat 480  
 ttatgaattt gagaacaatt ttgtgttggt acggtatttt actatggaat aatcaatcaa 540  
 ttgaggattt tatgcaaata tcgtttgaat atttttccga ccctttgagt acttttcttc 600  
 ataattgcat aatattgtcc gctgcccctt tttctgttag acggtgtctt gatctacttg 660  
 ctatcgttca acaccacctt attttctaac tatttttttt ttagctcatt tgaatcagct 720  
 tatggtgatg gcacattttt gcataaacct agctgtcctc gttgaacata ggaaaaaaaa 780  
 atatataaac aaggctcttt cactctcctt gcaatcagat ttgggtttgt tccctttatt 840  
 ttcataattc ttgtcatatt cttttctcaa ttattatttt ctactcataa cctcacgcaa 900  
 aataacacag tcaaacttag aattcggatc cggtagatac attgatgcta tcaatccaga 960  
 gaactggaaa gattgtgtag cttgaaaaa cggtgaaact tacgggtcca agattgtcta 1020  
 cagattttcc tgatttgcca gcttactatc cttcttgaaa atatgcactc tataatctttt 1080  
 agttcttaat tgcaacacat agatttgctg tataacgaat tttatgctat tttttaaatt 1140  
 tggagttcag tgataaaagt gtcacagcga atttcctcac atgtagggac cgaattgttt 1200

5 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Cebador de amplificación de G418  
 <400> 8

**gctctagatg agccatattc aacgggaaac 30**

15 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> Cebador de amplificación de G418



	<400> 9	<b>atggatcctt agaaaaactc atcgagcatc</b>	<b>30</b>
5	<210> 10 <211> 30 <212> ADN <213> artificial		
10	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 5' de PDC de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 10	<b>caagaaggta cccctctcta aacttgaaca</b>	<b>30</b>
15	<210> 11 <211> 32 <212> ADN <213> artificial		
20	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 5' de PDC1 de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 11	<b>gtaattcctg caggtgcaat tatttggtt gg</b>	<b>32</b>
25	<210> 12 <211> 32 <212> ADN <213> artificial		
30	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 3' de PDC de <i>K. marxianus</i>		
35	<400> 12	<b>ccaagccctg caggagaggg agaggataaa ga</b>	<b>32</b>
40	<210> 13 <211> 30 <212> ADN <213> artificial		
45	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 3' de PDC de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 13	<b>ctcgtaacgc gtgtacaagt tgtggaacaa</b>	<b>30</b>
50	<210> 14 <211> 30 <212> ADN <213> artificial		
55	<220> <223> Cebador de amplificación, con sitios de clonación múltiple y terminador CYC1 de <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 14	<b>atcctgcagg taatcgact cactataggg</b>	<b>30</b>

5	<210> 15 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación, con sitios de clonación múltiple y terminador CYC1 de <i>S. cerevisiae</i>	
10	<400> 15 ___ <b>tagagacgag cttgcaaatt aaagccttcg</b>	<b>30</b>
15	<210> 16 <211> 40 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación con terminador ScCYC1 y marcador de poli-his	
20	<400> 16 <b>atattaacct gcaggacatc atcaccatca ccattgagtt</b>	<b>40</b>
25	<210> 17 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador de amplificación con terminador ScCYC1 y marcador de poli-his	
30	<400> 17 <b>gaggaagcgg aagagcggcc aata</b>	<b>24</b>
35	<210> 18 <211> 29 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de resistencia a la higromicina	
	<400> 18 <b>aagctctaga tgaaaaagcc tgaactcac</b>	<b>29</b>
45	<210> 19 <211> 29 <212> ADN <213> artificial	
50	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de resistencia a la higromicina	
	<400> 19 <b>cgcggatccc tattcctttg ccctcggac</b>	<b>29</b>
55	<210> 20 <211> 60 <212> ADN <213> artificial	
60	<220>	

<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 20 ..

**agcgtgaaaa ggaacacatg gccactatgc ttaccatggc tcgtgactac gctcgttcca** 60

5

<210> 21

<211> 62

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 21

**ggttccattg gctttggttc aatgaggaaa gtacccttga atcccttggg acgagcgtag** 60

**tc** 62

15

<210> 22

<211> 55

<212> ADN

<213> artificial

20

<220>

<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

25

<400> 22

**ggtcgtgaag gttacatgag tctccttaac actgaccaa agcgtgaaaa ggaac** 55

<210> 23

<211> 52

<212> ADN

<213> artificial

30

<220>

<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

35

<400> 23

**gcggtttcag tgtcaacatc gtattgggtgc ttggttgggt ccattggctt tg** 52

<210> 24

<211> 60

<212> ADN

<213> artificial

40

<220>

<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

45

<400> 24

**gacgccggta ttgaacttgg tgctgaaaac tacgtcttct ggggtgggtcg tgaaggttac** 60

50

<210> 25

<211> 60

<212> ADN

<213> artificial

55

<220>

<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 25

	<b>ccttgaagtc cttgtctaag ttgtggcct taaggaaacc aatagcggtt tcagtgtaa</b>	<b>60</b>
5	<210> 26 <211> 63 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> <400> 26	
	<b>gactttgatg ttgtcgcccg tgctattggt caaattaaga acgccataga cgccggtatt</b>	<b>60</b>
	<b>gaa</b>	<b>63</b>
15	<210> 27 <211> 63 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> <400> 27	
	<b>gttcgaaagt gtgaccagca agagtagcgt ggttaacttc aatgttgacc ttgaagtcct</b>	<b>60</b>
	<b>tgt</b>	<b>63</b>
25	<210> 28 <211> 63 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> <400> 28	
	<b>acgtcttcgg tcacaagcgt tacatgaacg gtgcctccac taaccagac tttgatggtg</b>	<b>60</b>
	<b>tcg</b>	<b>63</b>
35	<210> 29 <211> 65 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> <400> 29	
	<b>agcatcaatg gaaccgagca taccagcatc aacagcacag gcaagttcgt gttcgaaagt</b>	<b>60</b>
45	<b>gtgac</b>	<b>65</b>
50	<210> 30 <211> 65 <212> ADN <213> artificial	

ES 2 385 561 T3

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 30  
**caaggaaaag caaaaggaaa ccggtattaa gcttctctgg agtactgcta acgtcttcgg** 60  
**tcaca** 65

5

<210> 31  
 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

15

<400> 31  
**tcaattggga attgatcagt atcccaaccg ttttggtagt caccacggtt agcatcaatg** 60  
**gaaccg** 66

<210> 32  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

25

<400> 32  
**ctctattgaa gaatacgaat ccaaccttaa ggctgtcgtt gcttacctca aggaaaagca** 60  
**aaag** 64

<210> 33  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

35

<400> 33  
**ccaccaccac ggatgatttc catccaagct tggacgagtt cgtattgatc aattgggaat** 60  
**tgat** 64

<210> 34  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> artificial

40

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

45

<400> 34  
**atactactgt ttccacgatg ttgatcttgt ttccgaaggt aactctattg aagaatacga** 60

50

<210> 35

ES 2 385 561 T3

	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 35		
	<b>agtagagtta cgacgagtct tggcatcgaa gttggtacca ccagtaacga aaccaccacc</b>	<b>60</b>	
	<b>acggat</b>	<b>66</b>	
10	<210> 36		
	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 36		
20	<b>gaaatcatgc aaaagcttgg tattccatac tactgtttcc acgat</b>	<b>45</b>	
	<210> 37		
	<211> 56		
	<212> ADN		
25	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
30	<400> 37		
	<b>gtgggcaatg atgatgtctt cgaggctcagt agagttacga cgagtcttgg catcga</b>	<b>56</b>	
	<210> 38		
	<211> 56		
35	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
40	<400> 38		
	<b>tgaaattgcc aagcaaaagg ttgatgctgg tttcgaaatc atgcaaaagc ttggtg</b>	<b>56</b>	
	<210> 39		
	<211> 51		
45	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 39		
	<b>gagccatagc atccatacca gaaacgtggg caatgatgat gtcttcgagg t</b>	<b>51</b>	
55	<210> 40		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> artificial		

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

5 <400> 40  
**caaaaggctg atgctggttt cgaaatcatg caaaagcttg gtattccata ctactgtttc 60**  
**cac 63**

<210> 41  
 <211> 67  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

15 <400> 41  
**gccatagcat ccataccaga aacgtgggca atgatgatgt cttcgaggtc agtagagtta 60**  
**cgacgag 67**

<210> 42  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

25 <400> 42  
**gtacaaagtc tttcccatgg aacgaaggta ctgatgctat tgaaattgcc aagcaaaagg 60**  
**ttgatgct 68**

<210> 43  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

35 <400> 43  
**gtatggagat tcttggagga gcttggcagc gttttcaaga gcacgagcca tagcatccat 60**  
**a 61**

40

<210> 44  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> artificial

45

<220>  
 <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 44

	<b>ggtggcacac tctttgccc gaaggctg accaattcgg tggaggtaca aagtctttcc</b>	<b>60</b>
	<b>c</b>	<b>61</b>
5	<210> 45 <211> 60 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> <400> 45	
	<b>ataccactgt cgaaggaagc gtaacgttcc ttcttcatct tgggtgatgg agattcttgg</b>	<b>60</b>
15	<210> 46 <211> 55 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> <400> 46	
	<b>gtaagaaat gaaggattgg ttacgtttcg ccatggcctg gtggcacact ctttg</b>	<b>55</b>
25	<210> 47 <211> 55 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> <400> 47	
	<b>gtgagcttac catcttcaa gtccttacca ataccactgt cgaaggaagc gtaac</b>	<b>55</b>
35	<210> 48 <211> 50 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> <400> 48	
45	<b>ctacgatgct gaaaaggaag tcatgggtaa gaaaatgaag gattggttac</b>	<b>50</b>
50	<210> 49 <211> 55 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>	



	<400> 49		
		<b>ttaccgtatt cgtaaacttg ttcgagggtg agcttaccat cttcaaagtc cttac</b>	<b>55</b>
5	<210> 50 <211> 60 <212> ADN <213> artificial		
10	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 50	<b>ggattctaag aatccattag ccttccacta ctacgatgct gaaaaggaag tcatgggtaa</b>	<b>60</b>
15	<210> 51 <211> 62 <212> ADN <213> artificial		
20	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 51	<b>gcttaccaga agtttgcttt ggttcacctg tcttcttacc gtattcgtaa acttggtcga</b>	<b>60</b>
		<b>gg</b>	<b>62</b>
25	<210> 52 <211> 65 <212> ADN <213> artificial		
30	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 52	<b>atggctaagg aatatttccc acaaattcaa aagattaagt tcgaaggtaa ggattctaag</b>	<b>60</b>
35		<b>aatcc</b>	<b>65</b>
40	<210> 53 <211> 55 <212> ADN <213> artificial		
	<220> <223> Cebador de reconstrucción del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
45	<400> 53	<b>ttattggtac atggcaacaa tagcttcgta gagttcttgc ttaccagaag tttgc</b>	<b>55</b>
50	<210> 54 <211> 35 <212> ADN <213> artificial		
55	<220> <223> Cebador mutagénico de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 54		

	<b>ggattggtta cgtttcgcca tggcctggtg gcaca</b>	<b>35</b>
5	<210> 55 <211> 35 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador mutagénico de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>	
	<400> 55 <b>ctatgcttac catggctcgt gactacgctc gttcc</b>	<b>35</b>
15	<210> 56 <211> 39 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Cebador mutagénico de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>	
	<400> 56 <b>gctggtatgc tcggttccat tgatgctaac cgtggtgac</b>	<b>39</b>
25	<210> 57 <211> 35 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Cebador mutagénico de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>	
35	<400> 57 <b>gttgcttacc tcaaggaaaa gcaaaaggaa accgg</b>	<b>35</b>
40	<210> 58 <211> 1314 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i> sp. E2 reconstruido	
	<400> 58	

atggctaagg aatatttccc acaaattcaa aagattaagt tcgaaggtaa ggattctaag 60  
 aatccattag ccttccacta ctacgatgct gaaaaggaag tcatgggtaa gaaaatgaag 120  
 gattggttac gtttcgccat ggcctgggtg cacactcttt gcgccgaagg tgctgaccaa 180  
 ttcgggtggag gtacaaagtc tttcccatgg aacgaaggta ctgatgctat tgaaattgcc 240  
 aagcaaaagg ttgatgctgg tttcgaaatc atgcaaaagc ttggtattcc atactactgt 300  
 ttccacgatg ttgatcttgt ttccgaagggt aactctattg aagaatacga atccaacctt 360  
 aaggctgtcg ttgcttacct caaggaaaag caaaaggaaa ccggtattaa gcttctctgg 420  
 agtactgcta acgtcttcgg tcacaagcgt tacatgaacg gtgcctccac taaccagac 480  
 tttgatggtg tcgcccgtgc tattgttcaa attaagaacg ccatagacgc cggatttgaa 540  
 cttggtgctg aaaactacgt cttctgggggt ggtcgtgaag gttacatgag tctccttaac 600  
 actgaccaa agcgtgaaaa ggaacacatg gccactatgc ttaccatggc tcgtgactac 660  
 gctcgttcca agggattcaa gggactttc ctcatgaac caaagccaat ggaaccaacc 720  
 aagcaccaat acgatggtga cactgaaacc gctattgggt tccttaaggc ccacaactta 780  
 gacaaggact tcaaggtaaa cattgaagtt aaccacgcta ctcttgctgg tcacactttc 840  
 gaacacgaac ttgcctgtgc tgttgatgct ggtatgctcg gttccattga tgctaaccgt 900  
 ggtgactacc aaaacgggtg ggatactgat caattcccaa ttgatcaata cgaactcgtc 960  
 caagcttgga tggaaatcat ccgtgggtgg ggtttcgta ctgggtggtac caacttcgat 1020  
 gccaaagact gtcgtaactc tactgacctc gaagacatca tcattgcca cgtttctggt 1080  
 atggatgcta tggctcgtgc tcttgaaaac gctgccaagc tcctccaaga atctccatac 1140  
 accaagatga agaaggaacg ttacgcttcc ttcgacagtg gtattggtaa ggactttgaa 1200  
 gatggtaagc tcaccctcga acaagtttac gaatacggta agaagaacgg tgaaccaaag 1260  
 caaacttctg gtaagcaaga actctacgaa gctattggtg ccatgtacca ataa 1314

5 <210> 59  
 <211> 437  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos deducida codificada por el gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces* sp. E2  
 reconstruido

<400> 59

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  
 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

5	<p>&lt;210&gt; 60                      &lt;211&gt; 42                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i></p>	
10	<p>&lt;400&gt; 60  <b>atcgtattcc tgcaggatgg ctaaggaata tttcccacaa at</b></p>	<b>42</b>
15	<p>&lt;210&gt; 61                      &lt;211&gt; 44                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Cebador de amplificación de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i></p>	
20	<p>&lt;400&gt; 61  <b>atatcgaacc tgcaggttat tggtagatgg caacaatagc ttcg</b></p>	<b>44</b>
25	<p>&lt;210&gt; 62                      &lt;211&gt; 43                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; artificial</p>	
30	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Cebador mutagénico del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i></p>	
	<p>&lt;400&gt; 62  <b>gctattggtg ccatgtacca acctgcagga catcatcacc atc</b></p>	<b>43</b>
35	<p>&lt;210&gt; 63                      &lt;211&gt; 26                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; artificial</p>	
40	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Cebador de amplificación para el flanco cadena arriba del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i></p>	
	<p>&lt;400&gt; 63  <b>aggtaatata ggtaaacaaa gatcac</b></p>	<b>26</b>
45	<p>&lt;210&gt; 64                      &lt;211&gt; 27                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; artificial</p>	
50	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Cebador de amplificación para el flanco cadena arriba del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i></p>	
	<p>&lt;400&gt; 64  <b>tatgtatgtg tgtgctactt accacag</b></p>	<b>27</b>
55	<p>&lt;210&gt; 65                      &lt;211&gt; 28                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; artificial</p>	
60	<p>&lt;220&gt;</p>	

	<223> Cebador de amplificación para el flanco cadena abajo del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 65	
	<b>cctggaattt tcatgaaact gatataag</b>	<b>28</b>
5	<210> 66	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador de amplificación para el flanco cadena abajo del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 66	
15	<b>actaaactcg ctttgttctg gctcatc</b>	<b>27</b>
	<210> 67	
	<211> 25	
	<212> ADN	
20	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de amplificación para la región de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
25	<400> 67	
	<b>gccagaggta gagagcacia agtaa</b>	<b>25</b>
	<210> 68	
30	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador de amplificación para la región de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 68	
	<b>cgaagccaac tcgcttctat ctggt</b>	<b>25</b>
40	<210> 69	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador de amplificación para la región promotora de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 69	
	<b>tattactgca gtgcacccga aaagtttgag a</b>	<b>31</b>
50	<210> 70	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de amplificación para la región promotora de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 70	
60	<b>atcgtctgca gactacacca gggcgtagta t</b>	<b>31</b>

	<210> 71		
	<211> 41		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador de amplificación para la región terminadora de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 71		
10	<b>cgtagtatct gggccctatc tggattatc taagaacgat t</b>		<b>41</b>
	<210> 72		
	<211> 43		
	<212> ADN		
15	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de amplificación para la región terminadora de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 72		
20	<b>tatacgtact tagggccgc tatgcccctc actttactaa tat</b>		<b>43</b>
	<210> 73		
	<211> 16		
25	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de amplificación para la región promotora de <i>K. marxianus</i>		
30	<400> 73		
	<b>cgtagtatct gggccc</b>		<b>16</b>
	<210> 74		
35	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
40	<223> Cebador de amplificación para la región promotora de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 74		
	<b>tatacgtact tagggccc</b>		<b>18</b>
45	<210> 75		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador de amplificación para la región promotora de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 75		
	<b>caggacttgt tgcgtggcgc</b>		<b>20</b>
55	<210> 76		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador de amplificación para la región promotora de <i>K. marxianus</i>		



	<400> 76		
	<b>gtatagatta acagtgtgtt</b>		20
5	<210> 77 <211> 25 <212> ADN <213> artificial		
10	<220> <223> Cebador de amplificación para la región promotora de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 77		
	<b>ccacgagcct catcacacga aaagt</b>		25
15	<210> 78 <211> 27 <212> ADN <213> artificial		
20	<220> <223> Cebador de amplificación del gen G418		
	<400> 78		
25	<b>gtcttcgatt tgacctactt ctaccag</b>		27
	<210> 79 <211> 24 <212> ADN <213> artificial		
30	<220> <223> Cebador de amplificación del gen G418		
	<400> 79		
35	<b>cgtaatagcg aagaggcccg cacc</b>		24
	<210> 80 <211> 28 <212> ADN <213> artificial		
40	<220> <223> Cebador de amplificación del gen G418		
	<400> 80		
45	<b>atccgttctc aatcactaca gtagctta</b>		28
	<210> 81 <211> 30 <212> ADN <213> artificial		
50	<220> <223> Cebador de amplificación para el gen de xiluloquinasa de <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 81		
55	<b>taggatccat gttgtgttca gtaattcaga</b>		30
60	<210> 82 <211> 30 <212> ADN		

<213> artificial

<220>

<223> Cebador de amplificación para el gen de xiluloquinasa de *S. cerevisiae*

5

<400> 82

**taggatcctt agatgagagt ctttccagt** 30

10

<210> 83

<211> 1803

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 83

**atgttgtgtt cagtaattca gagacagaca agagaggttt ccaacacaat gtctttagac** 60

**tcatactatc ttgggtttga tctttcgacc caacaactga aatgtctcgc cattaaccag** 120

**gacctaaaaa ttgtccattc agaaacagtg gaatttgaaa aggatcttcc gcattatcac** 180

**acaaagaagg gtgtctatat acacggcgac actatcgaat gtcccgtagc catgtggtta** 240

**gaggctctag atctggttct ctcgaaatat cgcgaggcta aatttccatt gaacaaagtt** 300

**atggccgtct cagggtcctg ccagcagcac gggctctgtct actggtcctc ccaagccgaa** 360

**tctctgttag agcaattgaa taagaaaccg gaaaaagatt tattgacta cgtgagctct** 420

**gtagcatttg caaggcaaac cgcccccaat tggcaagacc acagtactgc aaagcaatgt** 480

**caagagtttg aagagtgcac aggtgggcct gaaaaaatgg ctcaattaac agggtcaga** 540

**gccatttta gatttactgg tcctcaaat ctgaaaattg cacaattaga accagaagct** 600

**tacgaaaaaa caagaccat ttcttttagtg tctaattttt tgacttctat cttagtgggc** 660

**catcttgttg aattagagga ggcagatgcc tgtggatga acctttatga tatactgaa** 720

**agaaaattca gtgatgagct actacatcta attgatagtt cttctaagga taaaactatc** 780

**agacaaaaat taatgagagc accatgaaa aatttgatag cgggtaccat ctgtaaata** 840

**tttattgaga agtacggttt caatacaaac tgcaaggtct ctcccatgac tggggataat** 900

**ttagccacta tatgttcttt acccctgagg aagaatgacg ttctcgtttc cctaggaaca** 960

**agtactacag ttcttctggt caccgataag tatcaccct ctccgaacta tcatcttttc** 1020

**attcatccaa ctctgcaaaa ccattatatg ggtatgattt gttattgtaa tggttctttg** 1080

**gcaagggaga ggataagaga cgagttaaac aaagaacggg aaaataatta tgagaagact** 1140

**aacgattgga ctctttttaa tcaagctgtg ctagatgact cagaaagtag tgaaaatgaa** 1200

**ttaggtgtat attttctctt gggggagatc gttcctagcg taaaagccat aaacaaaagg** 1260

**gttatcttca atccaaaaac gggatgatt gaaagagagg tggccaagtt caaagacaag** 1320

**aggcacgatg ccaaaaatat tgtagaatca caggctttaa gttgcagggt aagaatatct** 1380

**cccctgcttt cggattcaaa cgcaagctca caacagagac tgaacgaaga tacaatcgtg** 1440

**aagtttgatt acgatgaatc tccgctgagg gactacctaa ataaaaggcc agaaaggact** 1500

15

**ttttttgtag gtggggcttc taaaaacgat gctattgtga agaagtttgc tcaagtcatt** 1560

ggtgctacaa agggtaattt taggctagaa acaccaaact catgtgccct tgggtggttgt 1620  
 tataaggcca tgtggtcatt gttatatgac tctaataaaa ttgcagttcc ttttgataaa 1680  
 tttctgaatg acaattttcc atggcatgta atggaaagca tatccgatgt ggataatgaa 1740  
 aattgggatc gctataattc caagattgtc cccttaagcg aactggaaaa gactctcatc 1800  
 taa 1803

<210> 84

<211> 600

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 84

Met Leu Cys Ser Val Ile Gln Arg Gln Thr Arg Glu Val Ser Asn Thr  
 1 5 10 15

Met Ser Leu Asp Ser Tyr Tyr Leu Gly Phe Asp Leu Ser Thr Gln Gln  
 20 25 30

Leu Lys Cys Leu Ala Ile Asn Gln Asp Leu Lys Ile Val His Ser Glu  
 35 40 45

Thr Val Glu Phe Glu Lys Asp Leu Pro His Tyr His Thr Lys Lys Gly  
 50 55 60

Val Tyr Ile His Gly Asp Thr Ile Glu Cys Pro Val Ala Met Trp Leu  
 65 70 75 80

Glu Ala Leu Asp Leu Val Leu Ser Lys Tyr Arg Glu Ala Lys Phe Pro  
 85 90 95

Leu Asn Lys Val Met Ala Val Ser Gly Ser Cys Gln Gln His Gly Ser  
 100 105 110

Val Tyr Trp Ser Ser Gln Ala Glu Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Lys  
 115 120 125

Lys Pro Glu Lys Asp Leu Leu His Tyr Val Ser Ser Val Ala Phe Ala  
 130 135 140

Arg Gln Thr Ala Pro Asn Trp Gln Asp His Ser Thr Ala Lys Gln Cys  
 145 150 155 160

Gln Glu Phe Glu Glu Cys Ile Gly Gly Pro Glu Lys Met Ala Gln Leu  
 165 170 175

Thr Gly Ser Arg Ala His Phe Arg Phe Thr Gly Pro Gln Ile Leu Lys  
 180 185 190

Ile Ala Gln Leu Glu Pro Glu Ala Tyr Glu Lys Thr Lys Thr Ile Ser

ES 2 385 561 T3

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

465                      470                      475                      480  
 Lys Phe Asp Tyr Asp Glu Ser Pro Leu Arg Asp Tyr Leu Asn Lys Arg  
     485    490    495  
 Pro Glu Arg Thr Phe Phe Val Gly Gly Ala Ser Lys Asn Asp Ala Ile  
     500    505  
 Val Lys Lys Phe Ala Gln Val Ile Gly Ala Thr Lys Gly Asn Phe Arg  
     515    520    525  
 Leu Glu Thr Pro Asn Ser Cys Ala Leu Gly Gly Cys Tyr Lys Ala Met  
     530    535    540  
 Trp Ser Leu Leu Tyr Asp Ser Asn Lys Ile Ala Val Pro Phe Asp Lys  
     545    550    555  
 Phe Leu Asn Asp Asn Phe Pro Trp His Val Met Glu Ser Ile Ser Asp  
     565    570    575  
 Val Asp Asn Glu Asn Trp Asp Arg Tyr Asn Ser Lys Ile Val Pro Leu  
     580    585    590  
 Ser Glu Leu Glu Lys Thr Leu Ile  
     595    600

5 <210> 85  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Cebador de amplificación para el promotor de TEF1 de *S. cerevisiae*

<400> 85  
**gacactatag aataactcaag cta**

23

15 <210> 86  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> Cebador de amplificación para el promotor de TEF1 de *S. cerevisiae*

<400> 86  
**cgctctagatt cctcaccttg tcgtattat**

29

25 <210> 87  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> Cebador de amplificación para el promotor de TEF1 de *S. cerevisiae*

	<400> 87	<b>tattacgtat atgcgaattc cccacacacc atagcttcaa aa</b>	<b>42</b>
5	<210> 88 <211> 45 <212> ADN <213> artificial		
10	<220> <223> Cebador de amplificación para el promotor de TEF1 de <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 88	<b>acgtattacg tagaattctg tcgtattata ctatgccgat atact</b>	<b>45</b>
15	<210> 89 <211> 20 <212> ADN <213> artificial		
20	<220> <223> Cebador de amplificación para el promotor de TEF1 de <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 89	<b>tattacgtat atgcgaattc</b>	<b>20</b>
25	<210> 90 <211> 18 <212> ADN <213> artificial		
30	<220> <223> Cebador de amplificación para el promotor de TEF1 de <i>S. cerevisiae</i>		
35	<400> 90	<b>acgtattacg tagaattc</b>	<b>18</b>
40	<210> 91 <211> 27 <212> ADN <213> artificial		
45	<220> <223> Cebador de amplificación del gen HisG/ <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 91	<b>ggactccgcg catcgccgta ccacttc</b>	<b>27</b>
50	<210> 92 <211> 20 <212> ADN <213> artificial		
55	<220> <223> Cebador de amplificación del gen HisG/ <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 92	<b>tacgggacat tcgatagtgt</b>	<b>20</b>
60	<210> 93		

	<211> 18 <212> ADN <213> artificial	
5	<220> <223> Cebador de amplificación del gen HisG/S. <i>cerevisiae</i>	
	<400> 93 <b>caggaaacag ctatgacc</b>	18
10	<210> 94 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> Cebador de amplificación del gen HisG/S. <i>cerevisiae</i>	
	<400> 94 <b>gtagtgaaaa tgaattaggt gtat</b>	24
20	<210> 95 <211> 18 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de xilulosaquinasa de <i>S. cerevisiae</i>	
30	<400> 95 <b>gttttcccag tcacgacg</b>	18
35	<210> 96 <211> 40 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 96 <b>acaaaaaca ctgcatagac taatattatt aatactatat</b>	40
45	<210> 97 <211> 40 <212> ADN <213> artificial	
50	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 97 <b>ggttgataat ttgtatTTTT gttattggta gcgctcgctc</b>	40
55	<210> 98 <211> 40 <212> ADN <213> artificial	
60	<220> <223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	

	<400> 98	<b>catgtttcaa aactgtgatt gaacgttatt tatgaatag</b>	<b>40</b>
5	<210> 99 <211> 40 <212> ADN <213> artificial		
10	<220> <223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>		
	<400> 99	<b>cctagggata ggttccgctc ctggtgggtt ataacgactc</b>	<b>40</b>
15	<210> 100 <211> 40 <212> ADN <213> artificial		
20	<220> <223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>		
25	<400> 100	<b>atctatgcat gccatgtttc aaaactgtga ttgaacgtta</b>	<b>40</b>
30	<210> 101 <211> 40 <212> ADN <213> artificial		
	<220> <223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>		
35	<400> 101	<b>agttaagcat gccctagggga taggttccgc tcctggtggg</b>	<b>40</b>
40	<210> 102 <211> 20 <212> ADN <213> artificial		
	<220> <223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>		
45	<400> 102	<b>atctatgcat gccatgtttc</b>	<b>20</b>
50	<210> 103 <211> 20 <212> ADN <213> artificial		
	<220> <223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>		
55	<400> 103	<b>agttaagcat gccctagggga</b>	<b>20</b>
60	<210> 104		



	<211> 25 <212> ADN <213> artificial	
5	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 104 <b>atgaccaaca ctcaaaaagc cgttg</b>	25
10	<210> 105 <211> 25 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 105 <b>tcattctgga ccatcaatga tagtc</b>	25
20	<210> 106 <211> 25 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de higromicina	
30	<400> 106 <b>atgttcacaa gatgaaatat taccc</b>	25
	<210> 107 <211> 25 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de higromicina	
40	<400> 107 <b>tgagcttggt atcgatagcg gaaga</b>	25
	<210> 108 <211> 25 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de higromicina	
50	<400> 108 <b>gtaggaacct ttggtgccac gtaag</b>	25
	<210> 109 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de higromicina	
60	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de higromicina	

	<400> 109		
	<b>ggccgcacta gagtcgacct g</b>		<b>21</b>
5	<210> 110 <211> 20 <212> ADN <213> artificial		
10	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 110		
	<b>tgaacggtgc ctccactaac</b>		<b>20</b>
15	<210> 111 <211> 20 <212> ADN <213> artificial		
20	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
	<400> 111		
25	<b>gccctctagg atcagcgggt</b>		<b>20</b>
	<210> 112 <211> 42 <212> ADN <213> artificial		
30	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
35	<400> 112		
	<b>atcgtattcc tgcaggatgg ctaaggaata tttcccacaa at</b>		<b>42</b>
	<210> 113 <211> 44 <212> ADN <213> artificial		
40	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
45	<400> 113		
	<b>atatcgaacc tgcaggttat tggtacatgg caacaatagc ttcg</b>		<b>44</b>
	<210> 114 <211> 33 <212> ADN <213> artificial		
50	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la lactato deshidrogenasa de <i>L. helveticus</i>		
55	<400> 114		
	<b>tattagcatg cgacgctcgggt aatctccgaa cag</b>		<b>33</b>
60	<210> 115		

	<211> 23 <212> ADN <213> artificial	
5	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la lactato deshidrogenasa de <i>L. helveticus</i>	
	<400> 115 <b>gaaatgcatg cccacaggac ggg</b>	23
10	<210> 116 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 116 <b>attaatccgc gggggaata cggacgggat tgaacgc</b>	37
20	<210> 117 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	
30	<400> 117 <b>tattaaccgc ggcttattgt ggatcgaatt gtaatgt</b>	37
35	<210> 118 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 118 <b>tagcagcagc ttccttatat</b>	20
45	<210> 119 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
50	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 119 <b>ctatggata gcgctgccta</b>	20
55	<210> 120 <211> 28 <212> ADN <213> artificial	
60	<220> <223> Cebador de amplificación del gen Ura3	

	<400> 120 <b>cttcaacaac aacaccactt gattcatg</b>	28
5	<210> 121 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador de amplificación del gen Ura3	
	<400> 121 <b>gtgcagttgg gttaagaata</b>	20
15	<210> 122 <211> 26 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de xiluloquinasa de <i>S. cerevisiae</i>	
	<400> 122 <b>gaggcagatg cctgtggtat gaacct</b>	26
25	<210> 123 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de xiluloquinasa de <i>S. cerevisiae</i>	
	<400> 123 <b>cgaaataaat ccgcggtcgc tgct</b>	24
35	<210> 124 <211> 36 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 124 <b>attataccgc gggtagagag caciaagtaa cgcaac</b>	36
45	<210> 125 <211> 36 <212> ADN <213> artificial	
50	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 125 <b>taatatccgc ggggctgtct tttgacaatt aggtcgc</b>	36
55	<210> 126 <211> 20	
60		

	<212> ADN <213> artificial	
5	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 126 <b>tcccctatat agatgatggc</b>	20
10	<210> 127 <211> 26 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 127 <b>ggatatctcaa acttttcggg tgcatt</b>	26
20	<210> 128 <211> 26 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 128 <b>tcccattgggt cgttaaatct caatcc</b>	26
30	<210> 129 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Cebador de amplificación del gen Ura3	
40	<400> 129 <b>gcccactatc ctttgctcgag</b>	20
45	<210> 130 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
50	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 130 <b>attatagagc tcggtagaga gcacaaagta acgcaac</b>	37
55	<210> 131 <211> 38 <212> ADN <213> artificial	
60	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	

	<400> 131 <b>tattaagcgg cgcggctgt cttttgacaa ttaggtcg</b>	<b>38</b>
5	<210> 132 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 132 <b>aggacgtgcg cacccacctg</b>	<b>20</b>
15	<210> 133 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 133 <b>gtttccacca cccagacaac</b>	<b>20</b>
25	<210> 134 <211> 23 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de <i>K. marxianus</i>	
	<400> 134 <b>caatgcaaag gtggtttatg taa</b>	<b>23</b>
35	<210> 135 <211> 45 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 5' del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>C. sonorensis</i>	
45	<400> 135 <b>actgtcgcgagc tcgtttaaac acctattcgg gagtcaatca accat</b>	<b>45</b>
50	<210> 136 <211> 40 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 5' del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>C. sonorensis</i>	
	<400> 136 <b>actgacgcgt cgacgtatgt ataataaggt atgattctgg</b>	<b>40</b>
60	<210> 137 <211> 39 <212> ADN	

	<213> artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de amplificación del flanco 3' del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>C. sonorensis</i>	
	<400> 137	
	<b>ggcccgcggc cgctaggcta gttttctaaa attttggtg</b>	<b>39</b>
10	<210> 138	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de amplificación del flanco 3' del gen de la xilitol deshidrogenasa de <i>C. sonorensis</i>	
	<400> 138	
	<b>gggacgggcc caagtatgag aaatattgat gatatag</b>	<b>37</b>
20	<210> 139	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de amplificación de la xilosa reductasa de <i>C. sonorensis</i>	
	<220>	
30	<221> característica_misc	
	<223> D = A/G/T; R = A/G; Y = C/T; W = A/T	
	<400> 139	
	<b>gadgaraart ayccwccagg wttcta</b>	<b>26</b>
35	<210> 140	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de amplificación de la xilosa reductasa de <i>C. sonorensis</i>	
	<220>	
45	<221> característica_misc	
	<223> D = A/G/T; K = G/T; Y = C/T; W = A/T; R = A/G	
	<400> 140	
	<b>ccadkyccaw ggrtyrttra atct</b>	<b>24</b>
50	<210> 141	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de amplificación del flanco 5' de la xilosa reductasa de <i>C. sonorensis</i>	
	<400> 141	
	<b>actgtcggagc tcgtttaaac cttcacctta aattccccaa ttgag</b>	<b>45</b>
60	<210> 142	
	<211> 41	

	<212> ADN <213> artificial		
5	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 5' de la xilosa reductasa de <i>C. sonorensis</i>		
	<400> 142 <b>actgacgcgt cgactcttgt ttgattgtgt gttgattgat c</b>		41
10	<210> 143 <211> 40 <212> ADN <213> artificial		
15	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 3' de la xilosa reductasa de <i>C. sonorensis</i>		
	<400> 143 <b>ggcccgcggc cgctaagcag ctagtatagg caagatgtag</b>		40
20	<210> 144 <211> 36 <212> ADN <213> artificial		
25	<220> <223> Cebador de amplificación del flanco 3' de la xilosa reductasa de <i>C. sonorensis</i>		
	<400> 144 <b>gggacggggc caactgtaat aatccgactt tcaacg</b>		36
30	<210> 145 <211> 76 <212> ADN <213> artificial		
35	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
40	<400> 145 <b>ggacatgcat gcatttgggg tacccaaggc cttccgctct agaaaacaat ggctaaggaa</b>		60
	<b>tatttcccac aaattc</b>		76
45	<210> 146 <211> 53 <212> ADN <213> artificial		
	<220> <223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>		
50	<400> 146 <b>ccaatgcatt ggttcctgca ggaattcga caacatcaaa gtctgggтта gtg</b>		53
55	<210> 147 <211> 53 <212> ADN <213> artificial		



	<220>		
	<223>	Cebador de amplificación del gen de xiluloquinasa de <i>S. cerevisiae</i>	
	<400>	147	
5		<b>aaggccttgc ggccgcctct agaaaacaat gttgtgttca gtaattcaga gac</b>	<b>53</b>
	<210>	148	
	<211>	35	
10	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador de amplificación del gen de xiluloquinasa de <i>S. cerevisiae</i>	
15	<400>	148	
		<b>gaaaaggcct tgttcaatgg aaatttagcc tcgcg</b>	<b>35</b>
	<210>	149	
	<211>	49	
20	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
25	<223>	Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>C. aberensis</i>	
	<220>		
	<221>	característica_misc	
	<223>	Y = C/T; M = A/C; R = A/G; S = G/C	
30	<400>	149	
		<b>aattaattcc tgcaggatgg ttaaggaata yttcycmrmc attsraaag</b>	<b>49</b>
	<210>	150	
	<211>	47	
35	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
40	<223>	Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de <i>C. aberensis</i>	
	<400>	150	
		<b>aattaattcc tgcaggttac atgtacatag caacaatagc ttcgtaa</b>	<b>47</b>
	<210>	151	
45	<211>	1314	
	<212>	ADN	
	<213>	<i>Cyllamyces aberensis</i>	
	<400>	151	

atggttaagg aatacttccc cgccattcaa aagattaagt tcgaaggtaa ggattccaag 60  
 aatccaatgg ccttccacta ttacgatgct gaaaaagaaa ttatgggtaa gaagatgaag 120  
 gattggttac gtttcgctat ggcctgggtg cacactcttt gtgccgaagg ttctgaccaa 180  
 ttcggtccag gtactaagac tttcccattg aacgaaggta ccgacccaat tgaaaaggct 240  
 aaacaaaagg tcgatgctgg tttcgaaatc atgaccaagc ttggtattga aactactgt 300  
 ttccacgatg ttgatcttgt tgatgaaggt aagaatggtg aagaatacga aaagaacctt 360  
 aagactatcg ttgcttacct taaggaaaag caaaaggaaa ctggtattaa acttctctgg 420  
 agtactgcta acgtcttcgg tcacaaacgt tacatgaacg gtgcttccac taaccagac 480  
 tttgatggtg ttgcccgtgc tattgttcaa attaagaacg ctatggatgc cggattgaa 540  
 ctggtgccc aaaactacgt cttctggggg ggtcgtgaag gttacatgag tctcctaac 600  
 actgaccaa agcgtgaaaa ggaacacatg gctatgatgc tcggtttagc cagagattac 660  
 gctcgttcca agggtttcaa gggactttc ctcattgaac caaagccaat ggaaccaacc 720  
 aagcaccaat acgatggtga cactgaaact gtcattggtt tcctcagagc tcatggttta 780  
 gacaaggact tcaagattaa cattgaagtt aaccacgcta ctcttgctgg tcacactttc 840  
 gaacacgaac ttgcctgtgc tgttgatgcc ggtatgctcg gttctattga tgctaaccgt 900  
 ggtgattacc aaaacggttg ggatactgat caattcccaa ttgaccaata cgagcttggt 960  
 caagcttggg tggaattat ccgtgggtg ggtttcacta ctgggtgtac taacttcgat 1020  
 gccaaagact gtcgtaactc taccgatctt gaagacatca ttattgccca ctttctggt 1080  
 atggatgcta tggctcgtgc cctcgaaaac gctgccaagc tccttaccga atctccatac 1140  
 aagaagatga aggctgaccg ttacgcttcc ttcgactctg gtatgggtaa ggacttcgaa 1200  
 gatggtaagc ttaccttcga acaagtttac gaatacggta agaaggtaa cgaacaaaa 1260  
 caaacctctg gtaaacaaga actttacgaa gctattggtg ctatgtacat gtaa 1314

<210> 152  
 <211> 437  
 <212> PRT  
 <213> *Cyllamyces aberensis*

<400> 152

10

Met Val Lys Glu Tyr Phe Pro Ala Ile Gln Lys Ile Lys Phe Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Ser Lys Asn Pro Met Ala Phe His Tyr Tyr Asp Ala Glu Lys  
 20 25 30  
 Glu Ile 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 Ser Asp Gln Phe Gly Pro Gly  
 50 55 60  
 Thr Lys Thr Phe Pro Trp Asn Glu Gly Thr Asp Pro Ile Glu Lys Ala  
 65 70 75 80  
 Lys Gln Lys Val Asp Ala Gly Phe Glu Ile Met Thr Lys Leu Gly Ile  
 85 90 95  
 Glu His Tyr Cys Phe His Asp Val Asp Leu Val Asp Glu Gly Lys Asn  
 100 105 110  
 Val Glu Glu Tyr Glu Lys Asn Leu Lys Thr Ile 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 Met 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  
 His Met Ala Met Met Leu Gly Leu 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 Val Ile Gly Phe Leu Arg  
 245 250 255  
 Ala His Gly Leu Asp Lys Asp Phe Lys Ile 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 Thr 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 Ile Ser Gly Met Asp Ala Met Ala Arg Ala Leu  
 355 360 365  
 Glu Asn Ala Ala Lys Leu Leu Thr Glu Ser Pro Tyr Lys Lys Met Lys  
 370 375 380  
 Ala Asp Arg Tyr Ala Ser Phe Asp Ser Gly Met Gly Lys Asp Phe Glu  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr Glu Tyr Gly Lys Lys Val  
 405 410 415  
 Asn Glu Pro Lys Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Leu Tyr Glu Ala Ile  
 420 425 430

Val Ala Met Tyr Met  
435

5 <210> 153  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> Cebador de aislamiento de Ura3 de *K. marxianus*

10 <400> 153  
**atatatgcat gccgtacctt agaatcctta tttgtatca** 39

15 <210> 154  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> Cebador de aislamiento de Ura3 de *K. marxianus*

20 <400> 154  
**atatatgcat gctaaactct ttttctttgg ttgtgaaat** 39

25 <210> 155  
<211> 1805  
<212> ADN  
<213> *Kluyveromyces marxianus*

<400> 155

ES 2 385 561 T3

ccgtacctta gaatccttat ttgtatcatc actcccagtc aacagtactc taatataatg 60  
 cgtatagtca aatctggccg gtcgaaacag ttttaatgga gttctcatat agaatgaagt 120  
 catctgataa accatagatc ttccaccagc agttaaagca ccaacaagtg acgaattctg 180  
 attggaaaga ccattctgct ttacttttag agcatcttgg tcttctgagc tcattataacc 240  
 tcaatcaaaa ctgaaattag gtgcctgtca cggctctttt tttactgtac ctgtgacttc 300  
 ctttcttatt tccaaggatg ctcatcacia tacgcttcta gatctattat gcattataat 360  
 taatagttgt agctacaaaa ggtaaaagaa agtccggggc aggcaacaat agaaatcggc 420  
 aaaaaaact acagaaatac taagagcttc ttccccattc agtcatcgca tttcgaaca 480  
 agaggggaat ggctctggct agggaactaa ccaccatcgc ctgactctat gcactaacca 540  
 cgtgactaca tatatgtgat cgtttttaac atttttcaaa ggctgtgtgt ctggctgttt 600  
 ccattaattt tcaactgatta agcagtcata ttgaatctga gctcatcacc aacaagaaat 660  
 actaccgtaa aagtgtaaaa gttcgtttaa atcatttgta aactggaaca gcaagaggaa 720  
 gtatcatcag ctagcccata aactaatcaa aggaggatgt cgactaagag ttactcggaa 780  
 agagcagctg ctcatagaag tccagttgct gccaaagcttt taaacttgat ggaagagaag 840  
 aagtcaaact tatgtgcttc tcttgatggt cgtaaaacaa cagagttggt aagattagtt 900  
 gaggttttgg gtccatatat ctgtctattg aagacacatg tagatatctt ggaggatttc 960  
 agctttgaga ataccattgt gccgttgaag caattagcag agaaacacia gtttttgata 1020

tttgaagaca ggaagtttgc cgacattggg aacctgtta aattacaata cacgtctggt 1080  
 gtataccgta tcgccgaatg gtctgatatc accaatgcac acggtgtgac tgggtcgggc 1140  
 attgttgctg gtttgaagca aggtgccgag gaagttacga aagaacctag agggttgtta 1200  
 atgcttgccg agttatcgtc caaggggtct ctagcgcacg gtgaatacac tcgtgggacc 1260  
 gtggaaattg ccaagagtga taaggacttt gttattggat ttattgctca aaacgatatg 1320  
 ggtggaagag aagagggcta cgattggttg atcatgacgc caggtgttgg tcttgatgac 1380  
 aaaggtgatg ctttgggaca acaatacaga actgtggatg aagttgttgc cggtggatca 1440  
 gacatcatta ttgttgtag aggtcttttc gcaaagggaa gagatcctgt agtgggaaggt 1500  
 gagagataca gaaaggcggg atgggacgct tacttgaaga gagtaggcag atccgcttaa 1560  
 gagtctccg agaacaagca gaggttcgag tgtactcggg tcagaagtta caagttgatc 1620  
 gtttatatat aaactataca gagatgtag agtgtaatgg cattgcgcac attgtatagc 1680  
 ctacaagttt agtcacgtgc tagaagctgt tttttgcac cgaaaatttt tttttttttt 1740  
 ttttttgttt tttggtgaag tacattatgt gaaatttcac aaccaagaa aaagagtta 1800  
 gcatg 1805

5 <210> 156  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Cebador de selección del gen Ura3 de *K. marxianus*

<400> 156  
**agtgtattca ccgtgcgcta ga** 22

15 <210> 157  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> Cebador de selección del gen Ura3 de *K. marxianus*

<400> 157  
**cccattcagt catcgcattt cg** 22

25 <210> 158  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> Cebador de selección interno del gen de la xilosa isomerasa de *C. aberensis*

<400> 158  
**cgatgttgac actgaaactg tc** 22

35 <210> 159  
 <211> 22

	<212> ADN <213> artificial	
5	<220> <223> Cebador de selección interno del gen de la xilosa isomerasa de <i>C. aberensis</i>	
	<400> 159 <b>gaagtcctta cccataccag ag</b>	22
10	<210> 160 <211> 42 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> Cebador de aislamiento del gen de la xilosa isomerasa de <i>B. thetaiotaomicron</i>	
	<400> 160 <b>aattaattcc tgcaggatgg caacaaaaga attttttccg gg</b>	42
20	<210> 161 <211> 43 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Cebador de aislamiento del gen de la xilosa isomerasa de <i>B. thetaiotaomicron</i>	
	<400> 161 <b>aattaattcc tgcaggtag caatacatat tcagaattgc ctc</b>	43
30	<210> 162 <211> 1317 <212> ADN <213> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	
35	<400> 162	



atggcaacaa aagaatTTTT tccgggaatt gaaaagatta aatttgaagg taaagatagt 60  
 aagaacccga tggcattccg ttattacgat gcagagaagg tgattaatgg taaaaagatg 120  
 aaggattggc tgagattcgc tatggcatgg tggcacacat tgtgCGctga aggtggTgat 180  
 cagttcggTg gcggaacaaa gcaattccca tggaatggta atgcagatgc tatacaggca 240  
 gcaaaagata agatggatgc aggatttgaa tTcatgcaga agatgggtat cgaatactat 300  
 tgcttccatg acgtagactt ggtttcggaa ggtgccagtg tagaagaata cgaagctaac 360  
 ctgaaagaaa tcgtagctta tgcaaaacag aaacaggcag aaaccggTat caaactactg 420  
 tggggTactg ctaatgtatt cggtcacgcc cgctatatga acggTgcagc taccaatcct 480  
 gacttCgatg tagtagctcg tgctgctgTt cagatcaaaa atgcgattga tgcaacgatt 540  
 gaactTggcg gagagaatta tgtgtttTgg ggtggTcgtg aaggctatat gtctcttctg 600  
 aacacagatc agaaacgtga aaaagaacac cttgcacaga tgttgacgat tgctcgtgac 660  
 tatgcccgtg cccgtggTtt caaaggTact ttctgatcg aaccgaaacc gatggaaccg 720  
 actaaacatc aatagacgt agatacggaa actgtaatcg gcttctgaa agctcatggt 780  
 ctggataagg atttcaaagt aaatacgag gtgaatcacg caactttggc aggtcacact 840  
 ttcgagcatg aattggctgt agctgtagac aatggTatgt tgggctcaat tgacgccaat 900  
 cgtggTgact atcagaatgg ctgggataca gaccaattcc cgatcgacaa ttatgaactg 960  
 actcaggcta tgatgcagat tatccgtaat ggtggTctcg gtaccggTgg tacgaacttt 1020  
 gatgctaaaa cccgtcgtaa ttctactgat ctggaagata tctttattgc tcacategca 1080  
 ggtatggacg ctatggcccg tgactcgaag agtgcagcgg ctctgctcga cgaatctccc 1140  
 tataagaaga tgctggctga ccgttatgct tcatttgatg ggggcaaagg taaagaattt 1200  
 gaagacggca agctgactct ggaggatgtg gttgcttatg caaaaacaaa aggcgaaccg 1260  
 aaacagacta gcggcaagca agaactttat gaggcaattc tgaatatgta ttgctaa 1317

<210> 163

<211> 438

<212> PRT

5 <213> *Bacteroides thetaiotaomicron*

<400> 163

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

ES 2 385 561 T3

180  
 Arg Glu Gly Tyr Met Ser Leu Leu Asn Thr Asp Gln Lys Arg Glu Lys  
 195 200 205

Glu His Leu Ala Gln Met Leu Thr Ile Ala Arg Asp Tyr Ala Arg Ala  
 210 215 220

Arg Gly Phe Lys Gly Thr Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Met Glu Pro  
 225 230 235 240

Thr Lys His Gln Tyr Asp Val Asp Thr Glu Thr Val Ile Gly Phe Leu  
 245 250 255

Lys Ala His Gly Leu Asp Lys Asp Phe Lys Val Asn Ile Glu Val Asn  
 260 265 270

His Ala Thr Leu Ala Gly His Thr Phe Glu His Glu Leu Ala Val Ala  
 275 280 285

Val Asp Asn Gly Met Leu Gly Ser Ile Asp Ala Asn Arg Gly Asp Tyr  
 290 295 300

Gln Asn Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Ile Asp Asn Tyr Glu Leu  
 305 310 315 320

Thr Gln Ala Met Met Gln Ile Ile Arg Asn Gly Gly Leu Gly Thr Gly  
 325 330 335

Gly Thr Asn Phe Asp Ala Lys Thr Arg Arg Asn Ser Thr Asp Leu Glu  
 340 345 350

Asp Ile Phe Ile Ala His Ile Ala Gly Met Asp Ala Met Ala Arg Ala  
 355 360 365

Leu Glu Ser Ala Ala Ala Leu Leu Asp Glu Ser Pro Tyr Lys Lys Met  
 370 375 380

Leu Ala Asp Arg Tyr Ala Ser Phe Asp Gly Gly Lys Gly Lys Glu Phe  
 385 390 395 400

Glu Asp Gly Lys Leu Thr Leu Glu Asp Val Val Ala Tyr Ala Lys Thr  
 405 410 415

Lys Gly Glu Pro Lys Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Leu Tyr Glu Ala  
 420 425 430

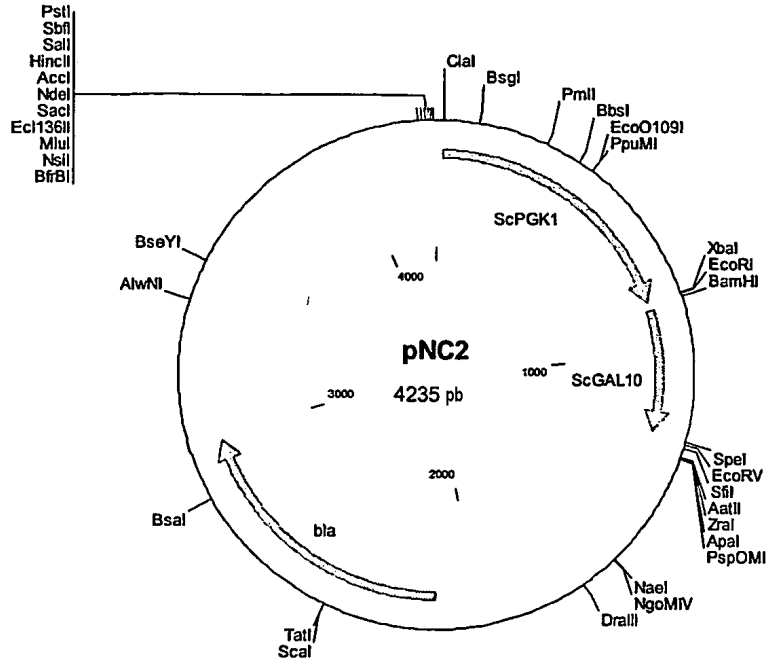
Ile Leu Asn Met Tyr Cys  
 435

5	<p>&lt;210&gt; 164                  &lt;211&gt; 19                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador de selección del gen de la xilosa isomerasa de <i>B. thetaiotaomicron</i></p>	
10	<p>&lt;400&gt; 164  <b>ggcgtgaatg taagcgtga</b></p>	<b>19</b>
15	<p>&lt;210&gt; 165                  &lt;211&gt; 21                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador de selección del gen de la xilosa isomerasa de <i>B. thetaiotaomicron</i></p>	
20	<p>&lt;400&gt; 165  <b>ctgtagacaa tggatgttg g</b></p>	<b>21</b>
25	<p>&lt;210&gt; 166                  &lt;211&gt; 32                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador de amplicación con promotor de PDC de <i>K. marxianus</i>, xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>, y terminador CYC1 de <i>S. cerevisiae</i></p>	
30	<p>&lt;400&gt; 166  <b>attgtaatt aactctctaa acttgaacag cc</b></p>	<b>32</b>
35	<p>&lt;210&gt; 167                  &lt;211&gt; 34                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador de amplicación con promotor de PDC de <i>K. marxianus</i>, xilosa isomerasa de <i>Piromyces</i>, y terminador CYC1 de <i>S. cerevisiae</i></p>	
40	<p>&lt;400&gt; 167  <b>attaatacgc gtagcttgca aattaaagcc ttcg</b></p>	<b>34</b>

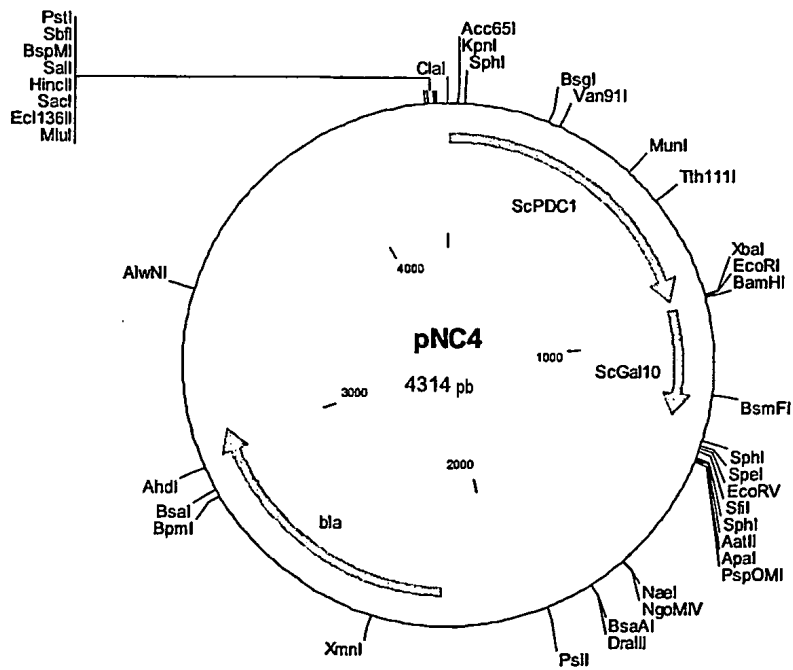
## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una célula de levadura genéticamente modificada que tiene un genoma y un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno está unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, teniendo la célula de levadura modificada también una delección o alteración de un gen de xilosa reductasa funcional nativo que produce una enzima que cataliza la conversión de la xilosa en xilitol, y teniendo la célula también una delección o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa nativo.
- 10 2.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 1, que contiene un gen de xiluloquinasa exógeno funcional unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura.
- 3.- Una célula de levadura genéticamente modificada del género *Kluyveromyces*, que tiene integrado en su genoma un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno está unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, y en la que la célula tiene también una delección o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa nativo.
- 15 4.- Una célula de levadura genéticamente modificada del género *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces* o *Pachysolen* que tiene un genoma y un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno está unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, y que contiene también un gen de xiluloquinasa exógeno funcional unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, en la que la célula tiene también una delección o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa nativo.
- 20 5.- La célula de levadura genéticamente modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene también integrado en su genoma un gen de lactato deshidrogenasa exógeno funcional, en la que el gen de lactato deshidrogenasa exógeno está unido operablemente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura.
- 25 6.- Un proceso de fermentación en el que una célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 se cultiva bajo condiciones de fermentación en un caldo de cultivo de fermentación que incluye xilosa.
- 7.- Una célula de levadura genéticamente modificada que tiene un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional integrado en su genoma, teniendo dicha célula una actividad xiluloquinasa de al menos 100 mU/mg, y teniendo una delección o alteración de un gen de xilitol deshidrogenasa.
- 30 8.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 7, que tiene una actividad xilitol deshidrogenasa no mayor que 2 mU/mg.
- 9.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 7 u 8, que tiene también una actividad xilosa reductasa no mayor que 10 mU/mg.

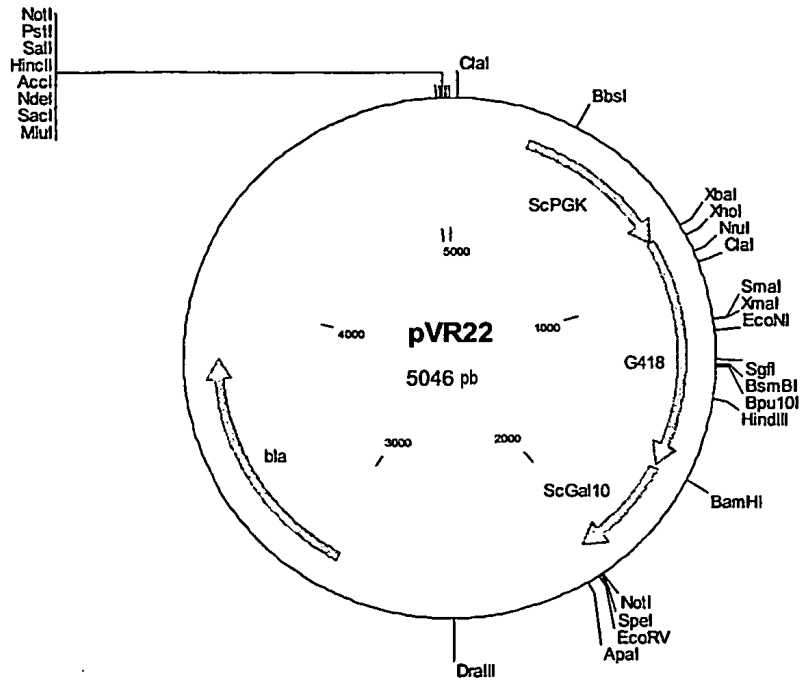
**Fig. 1**



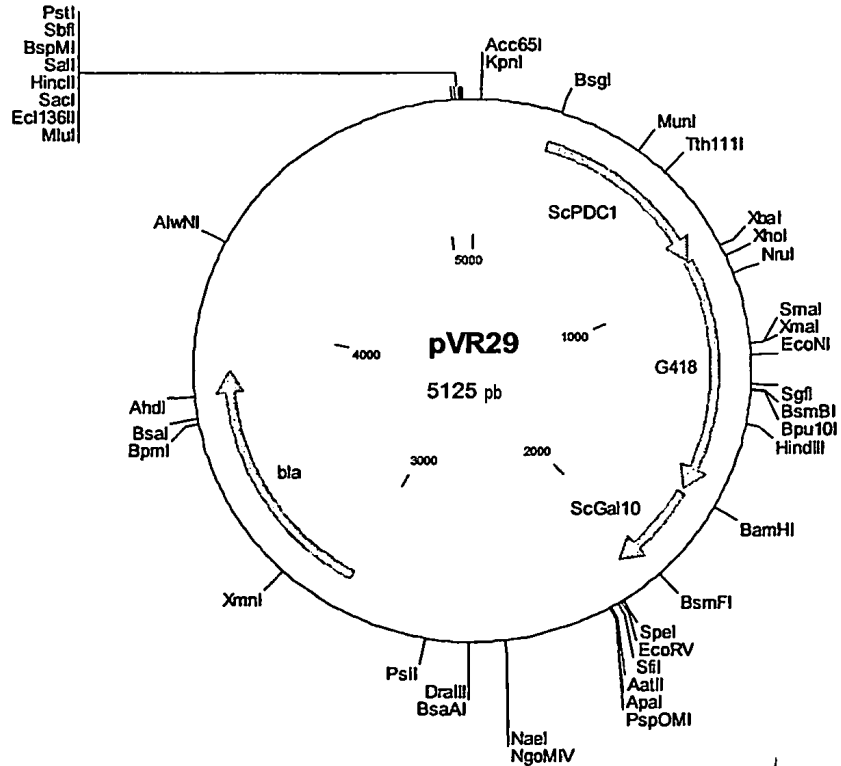
**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**

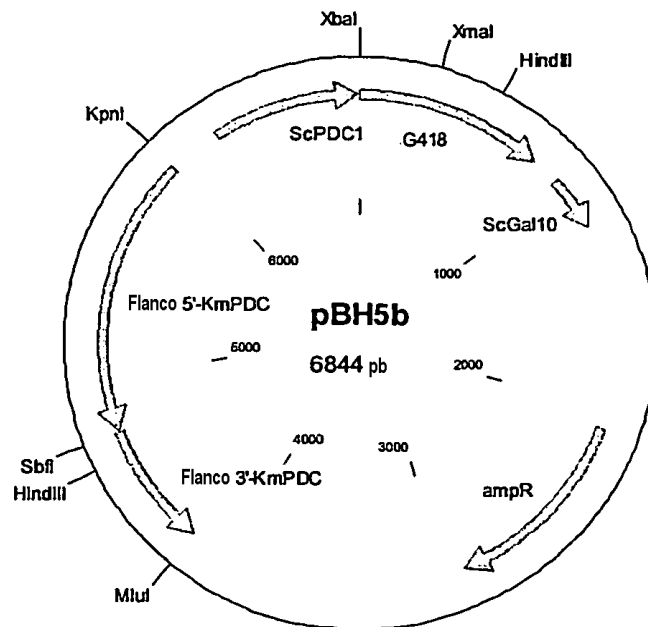
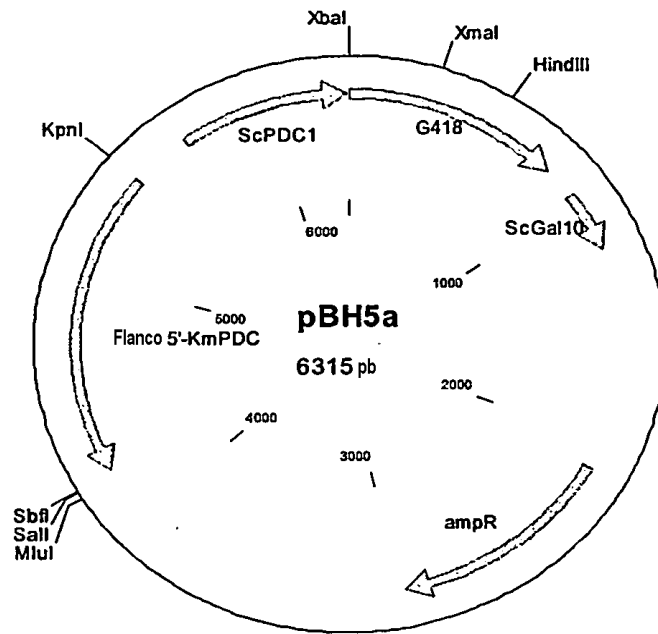




Fig. 6

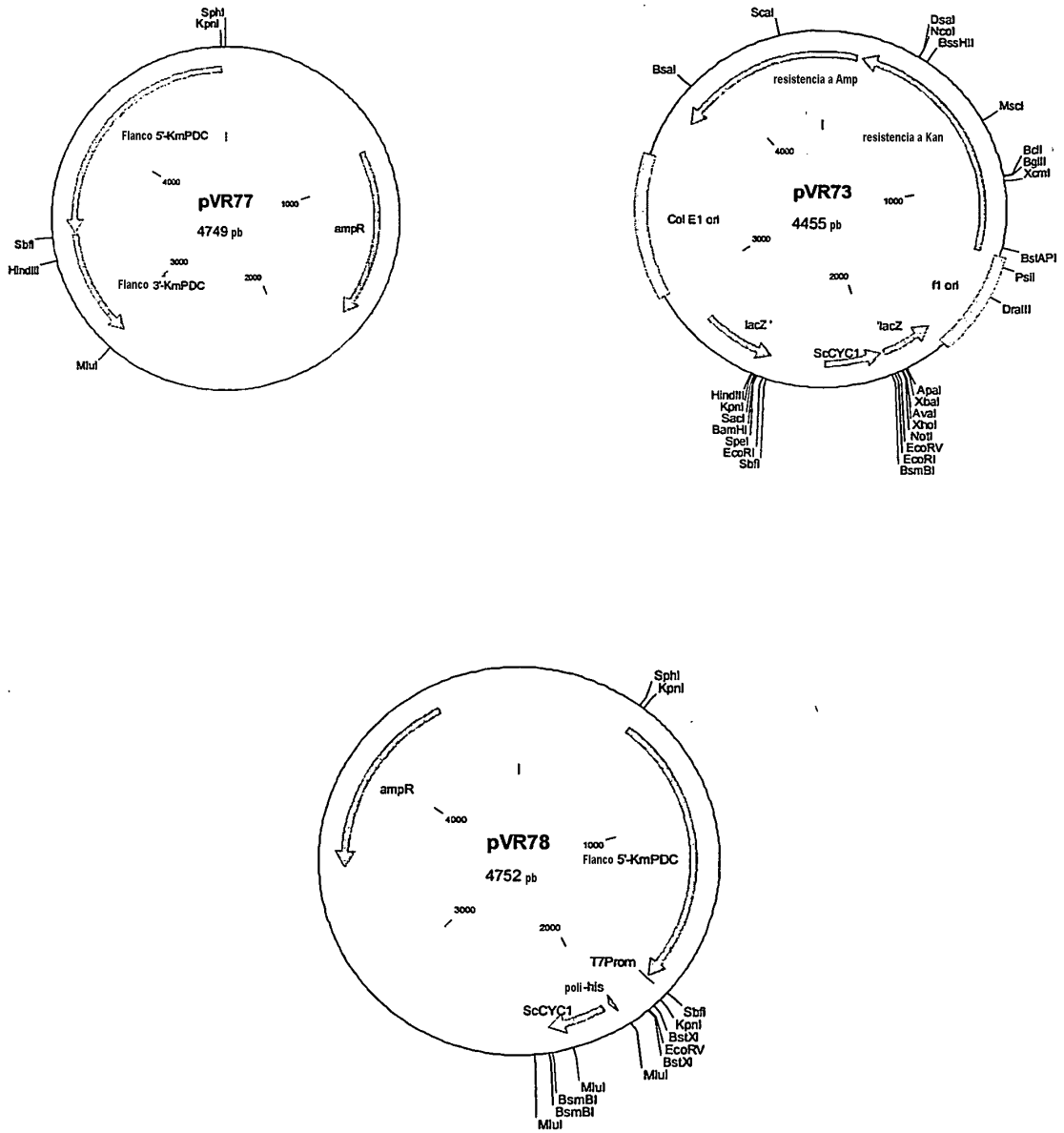


Fig. 7

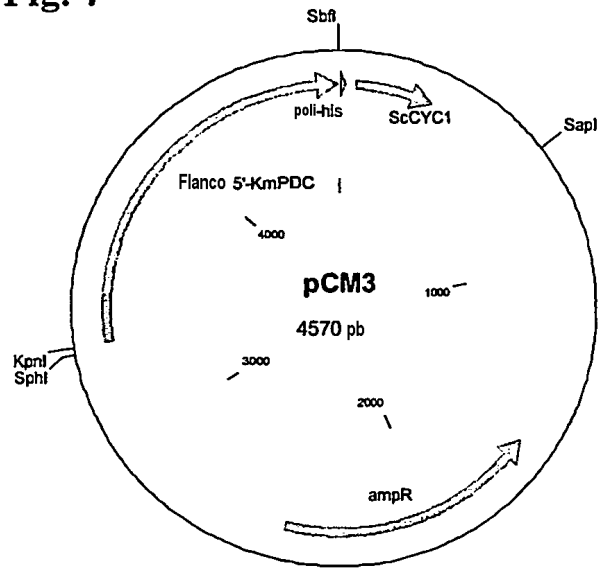


Fig. 8

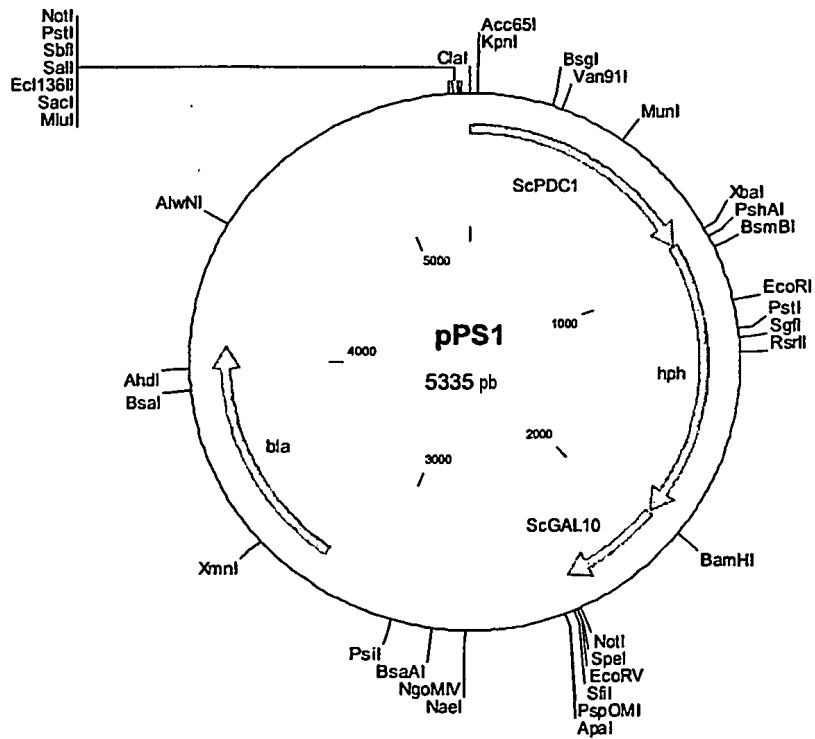


Fig. 9

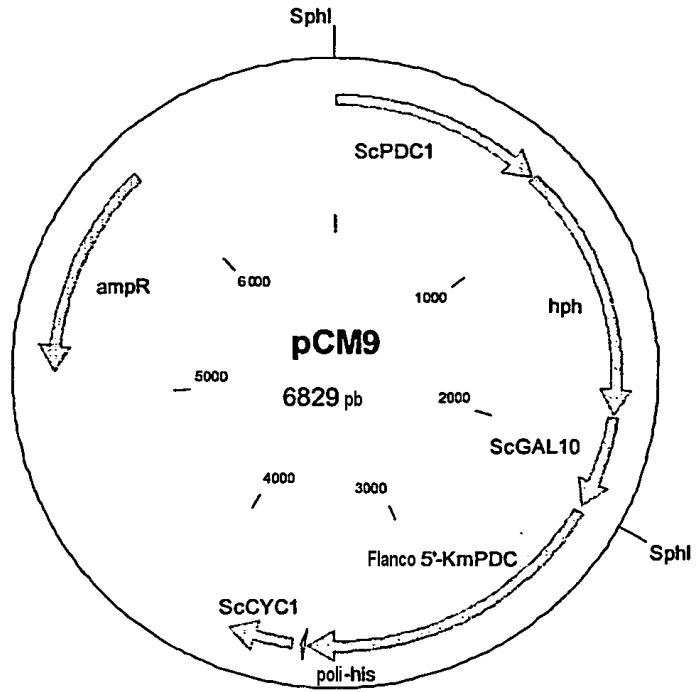
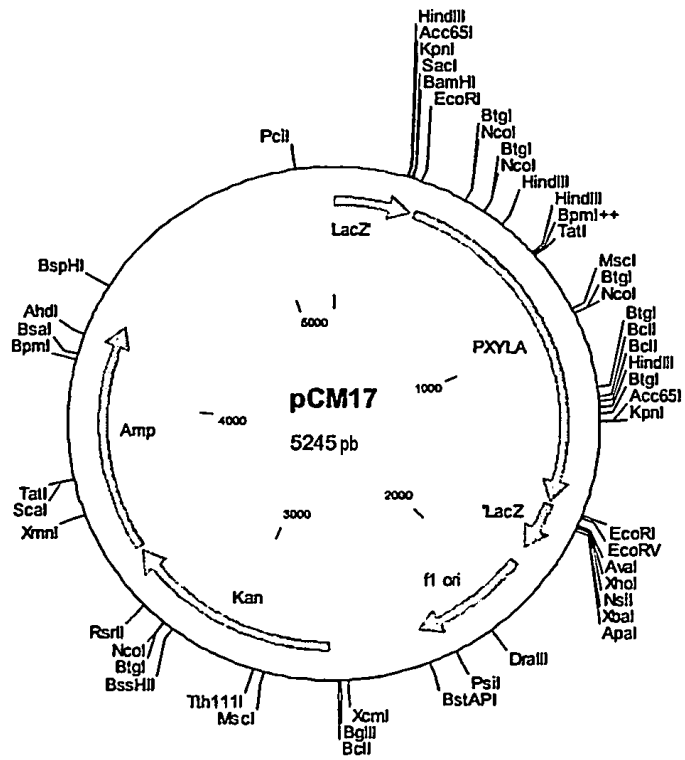


Fig. 10







**Fig. 15**

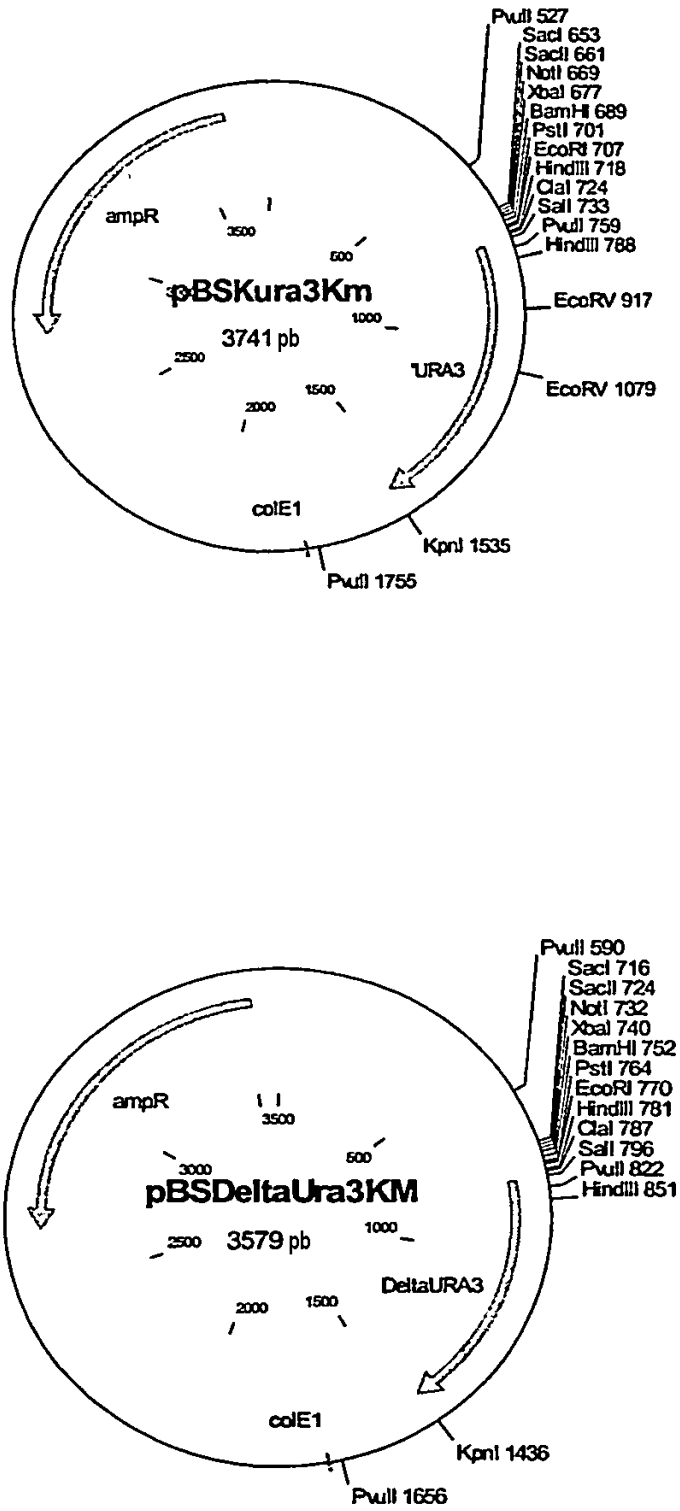


Fig. 16

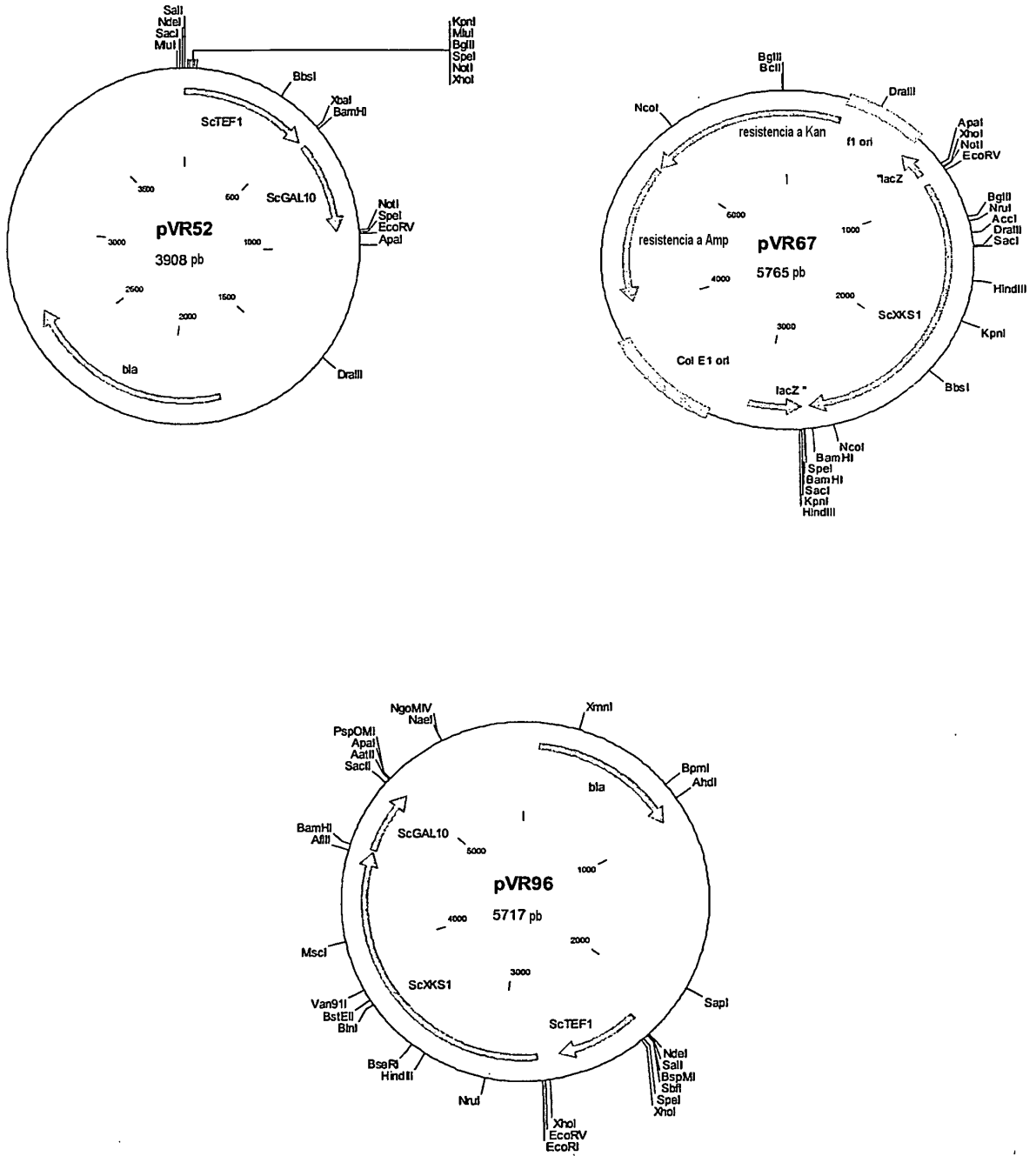


Fig. 17

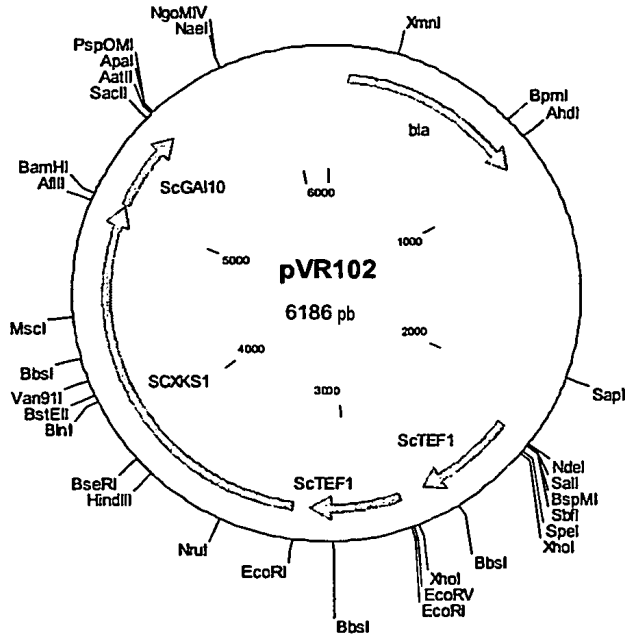


Fig. 18

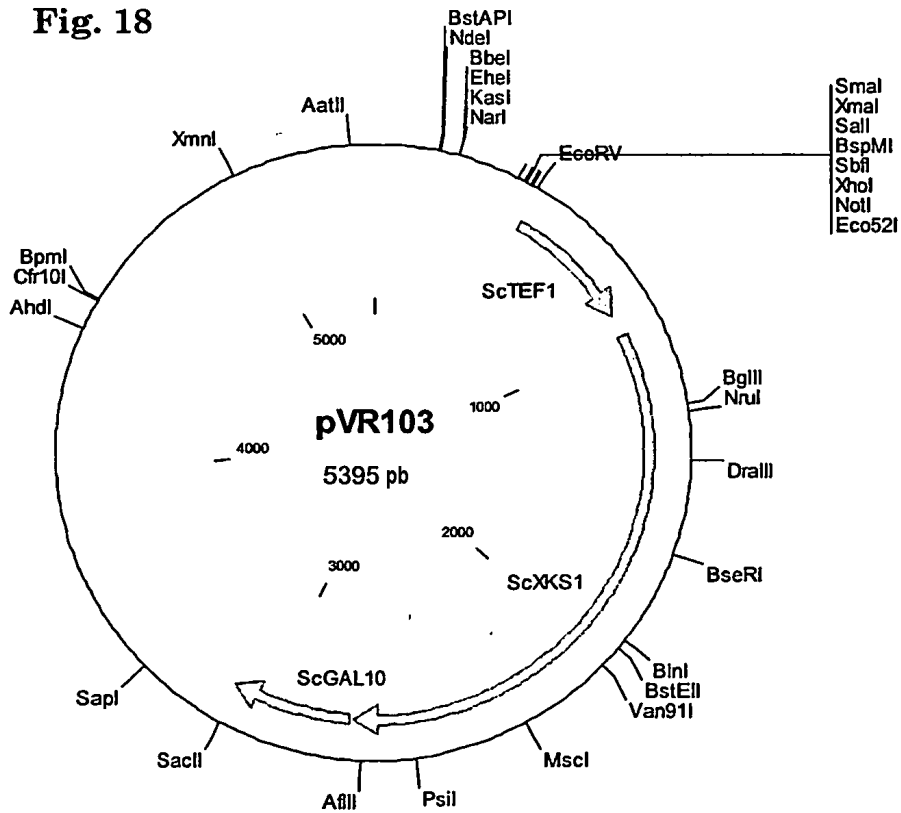




Fig. 19

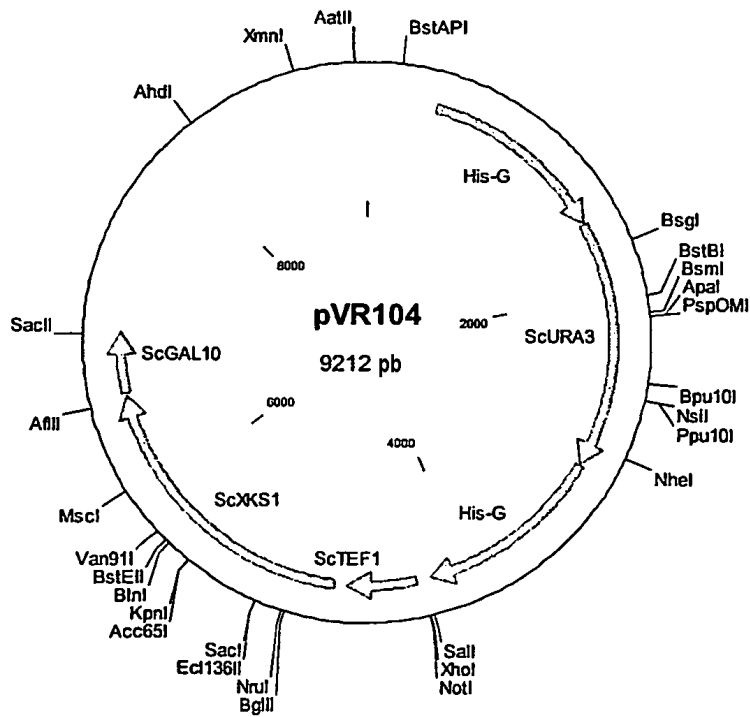
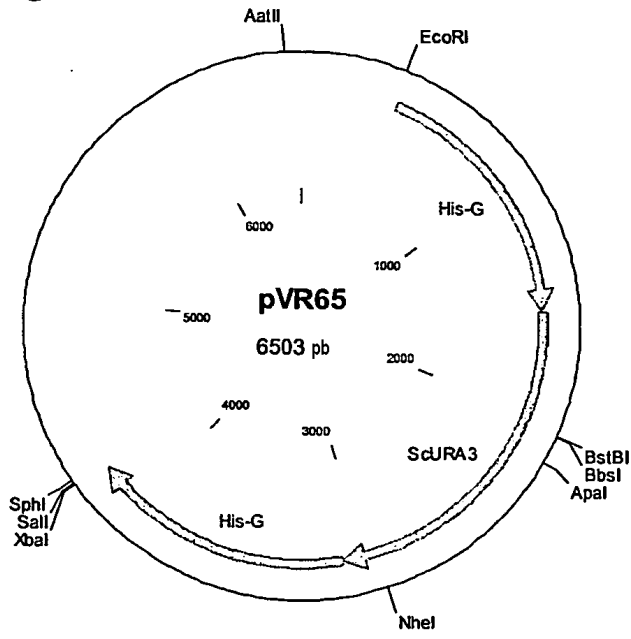
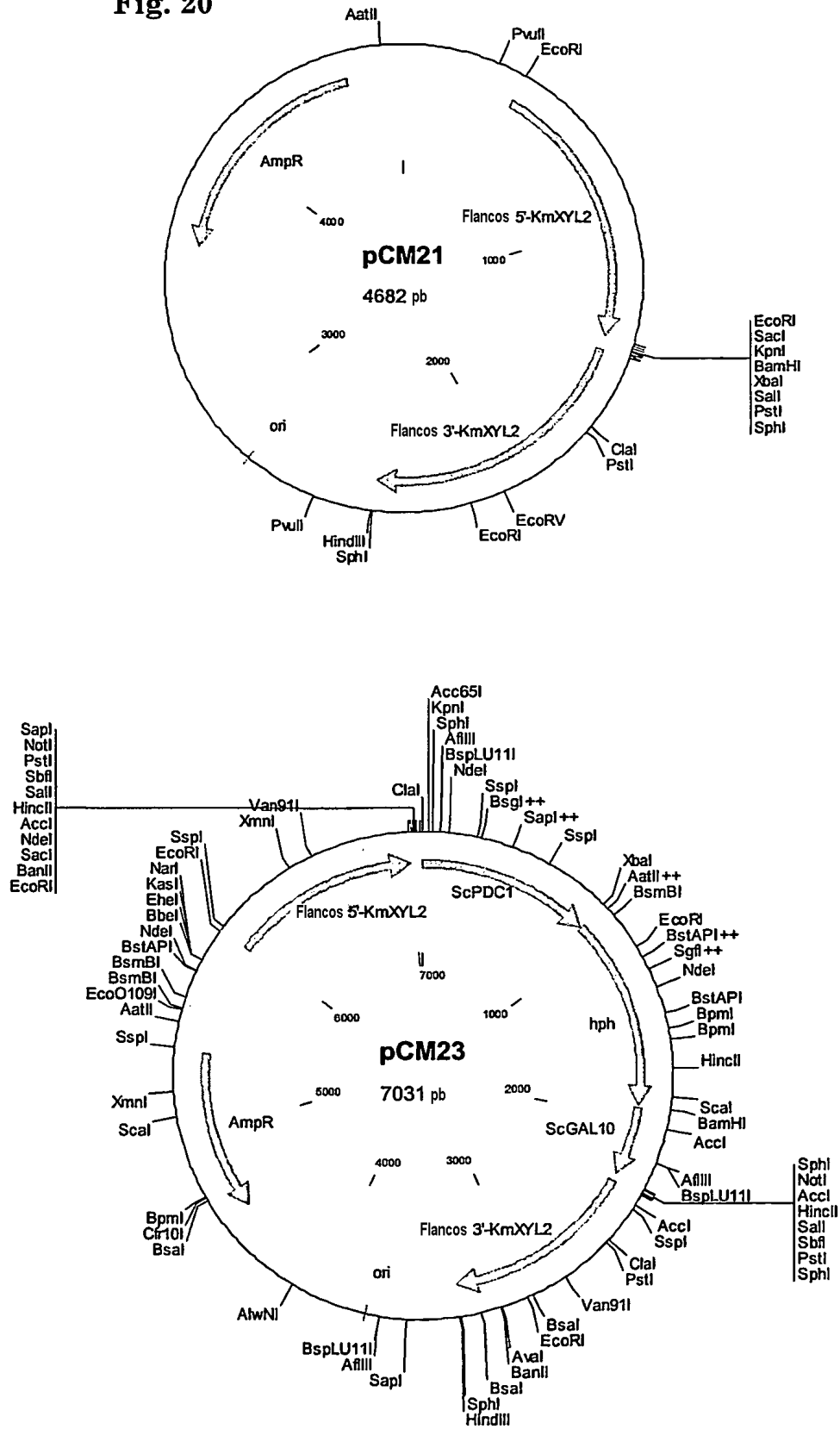
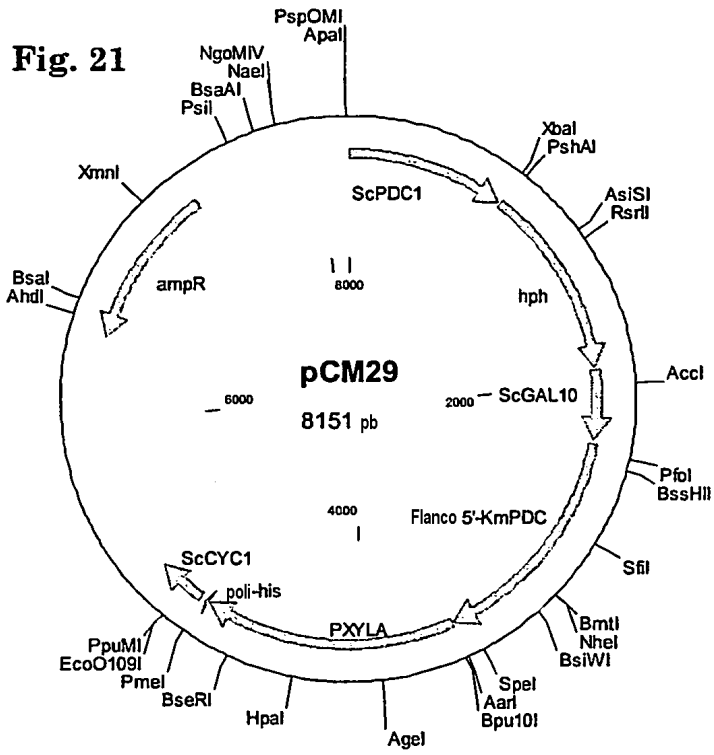
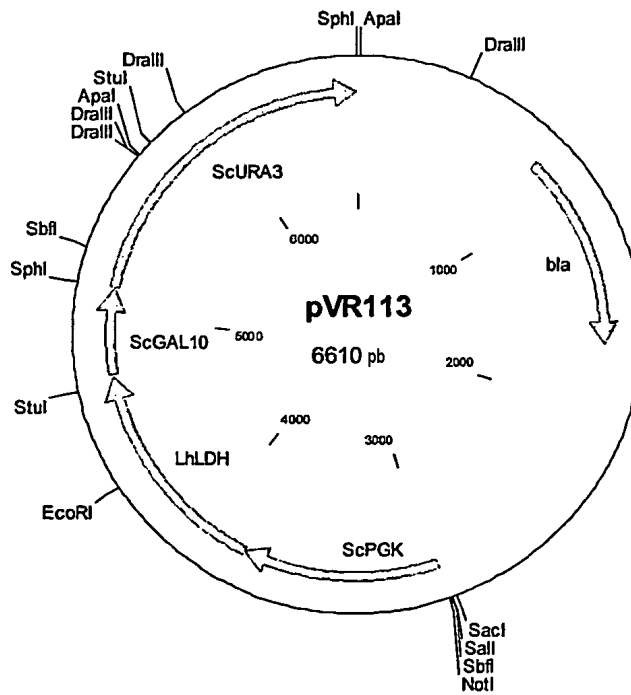


Fig. 20





**Fig. 22**



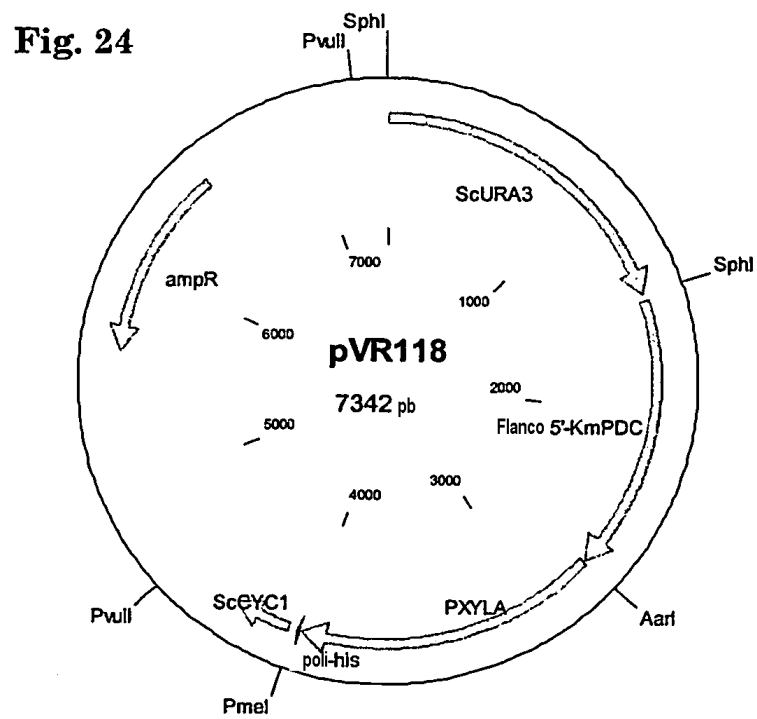
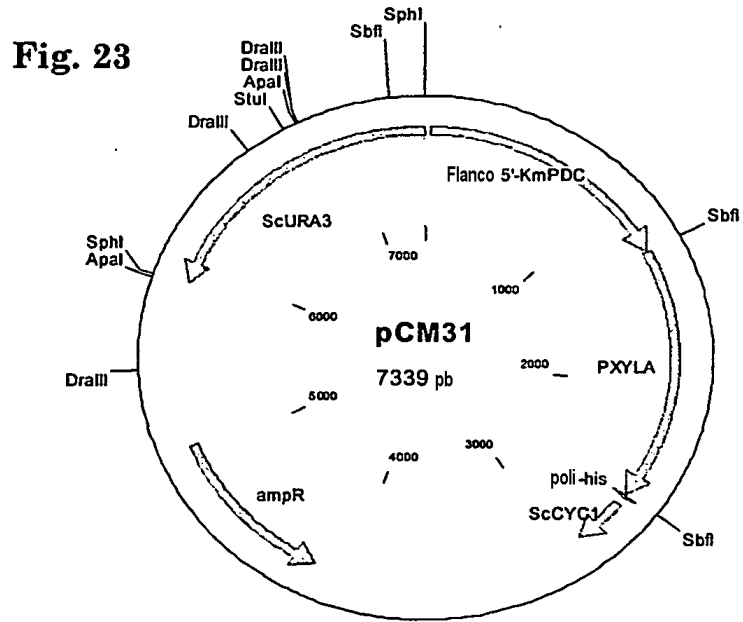


Fig. 25

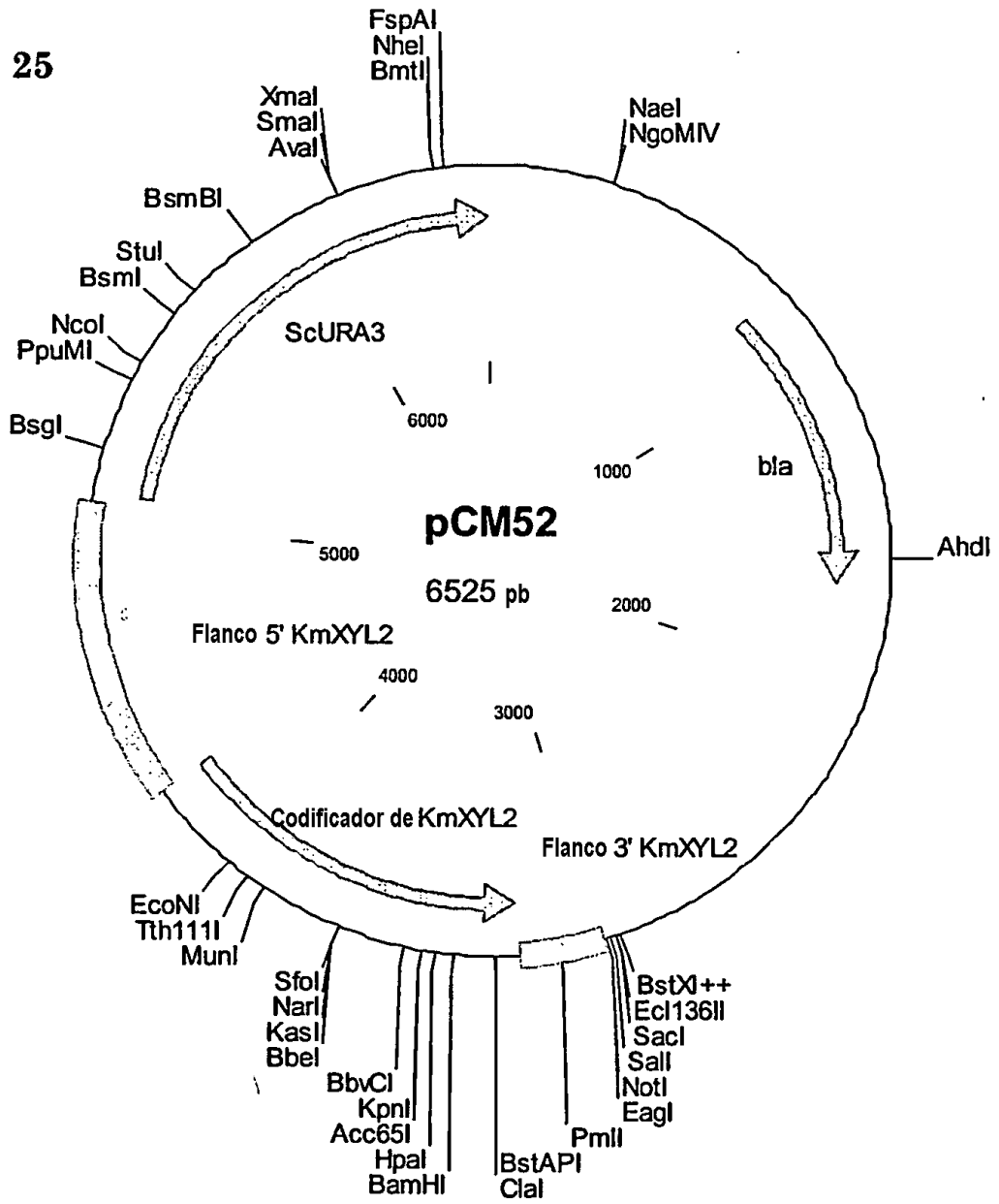


Fig. 26

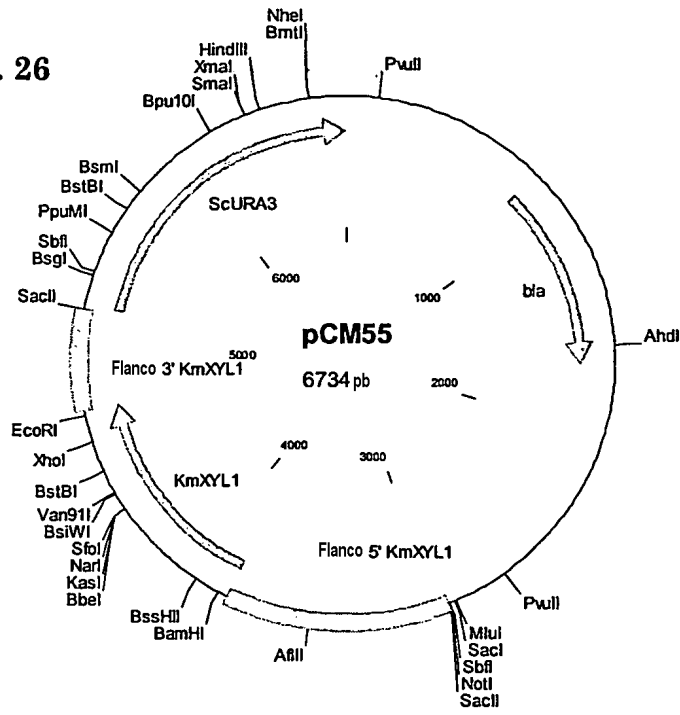


Fig. 27

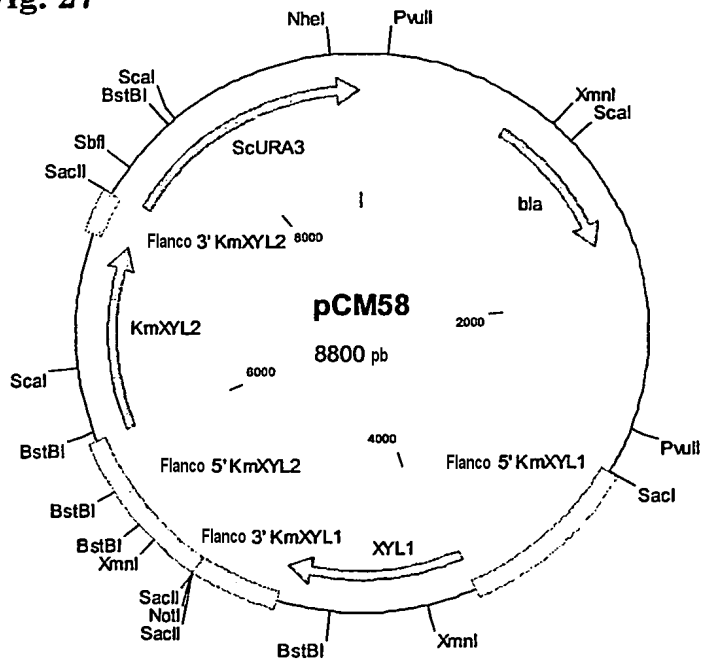


Fig. 28

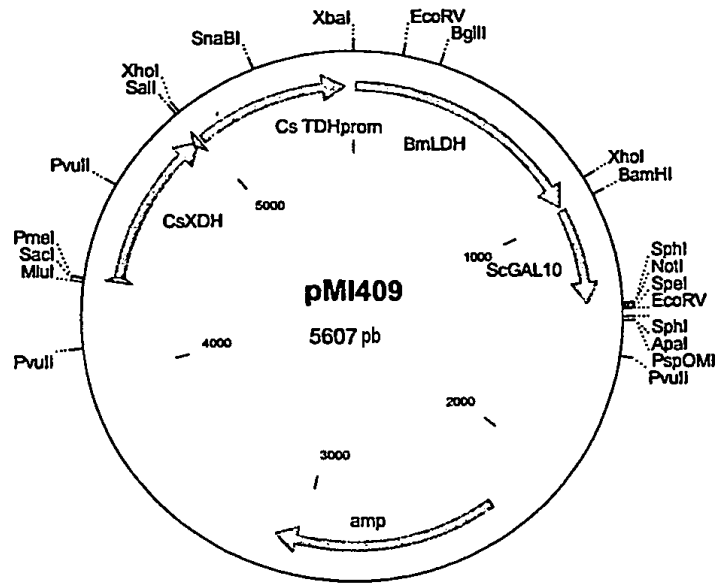
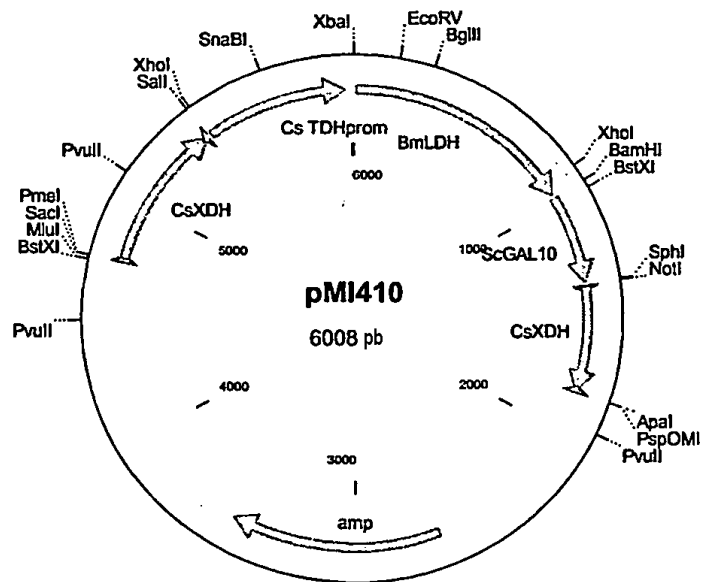
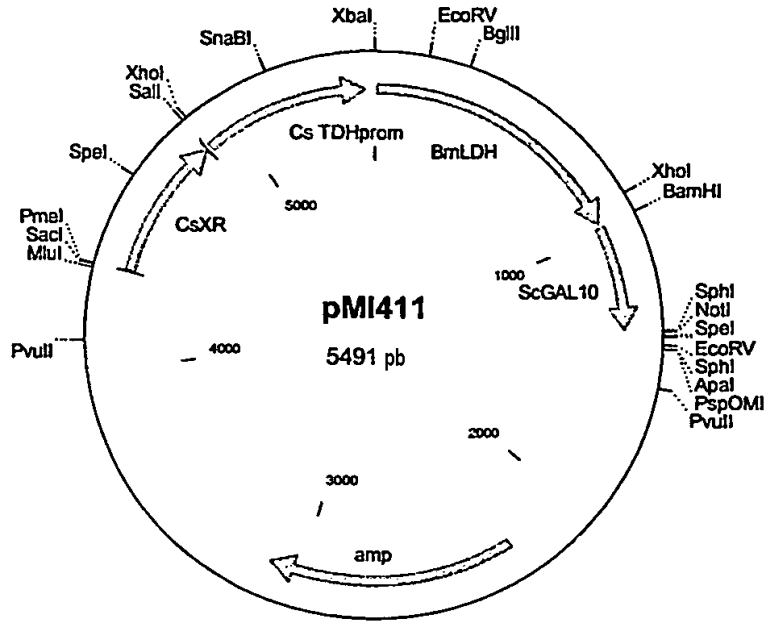


Fig. 29



**Fig.30**



**Fig. 31**

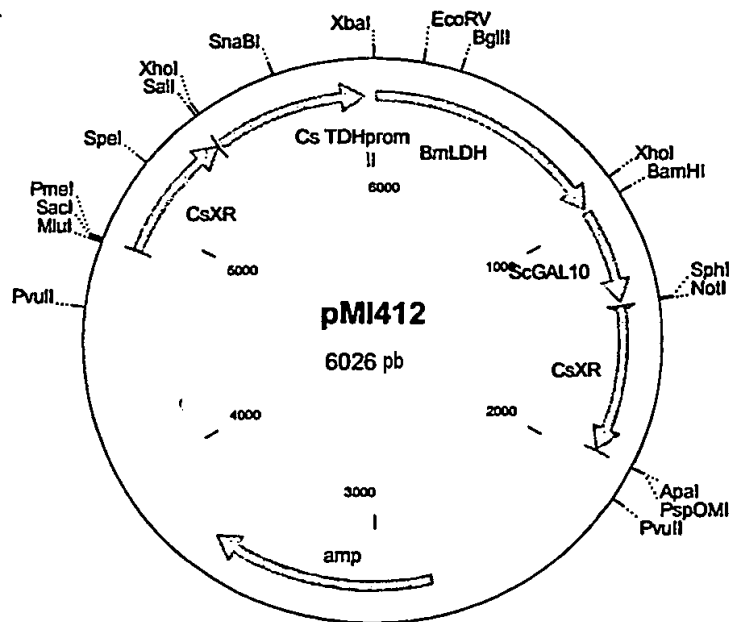




Fig. 32

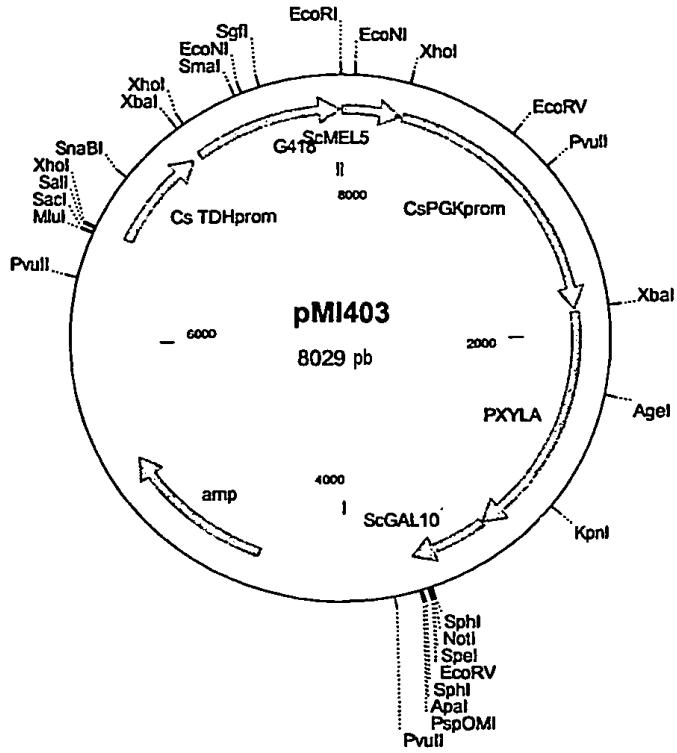
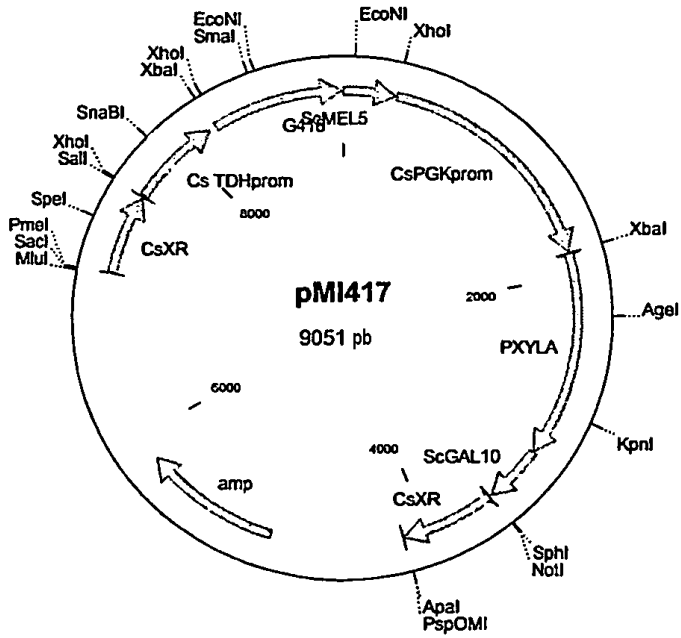
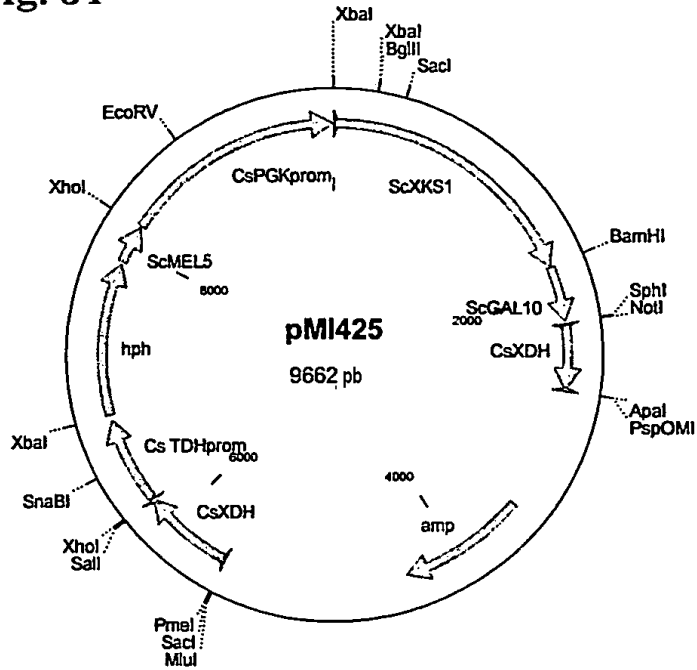


Fig. 33



**Fig. 34**



**Fig.35**

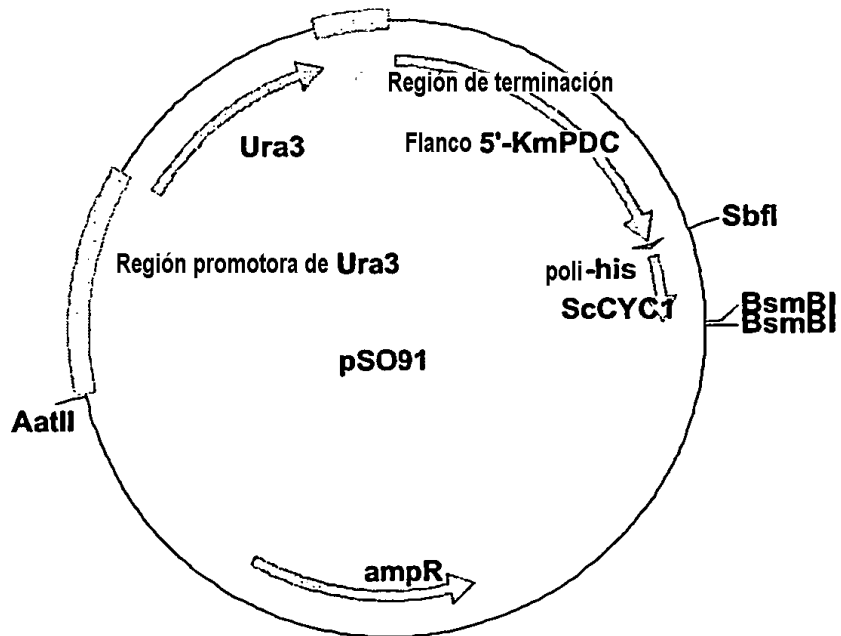


Fig. 36

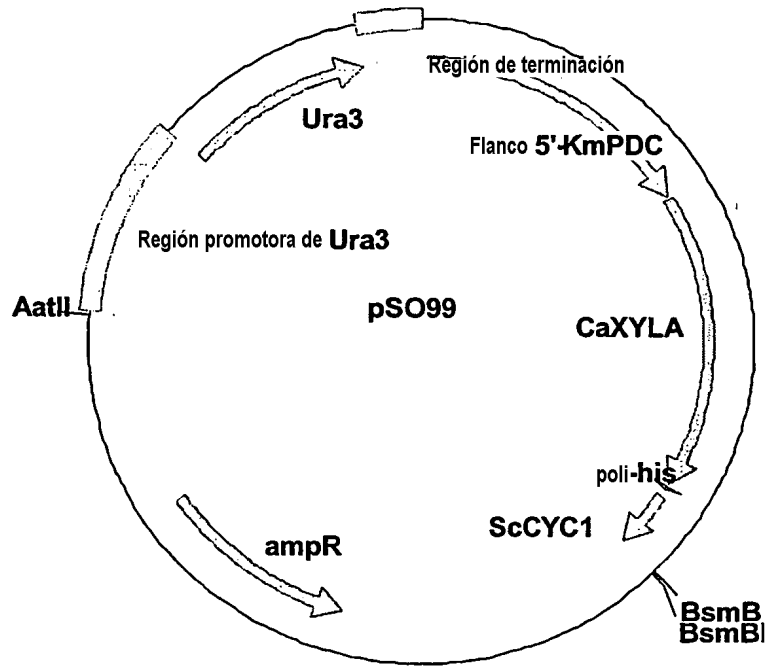


Fig. 37

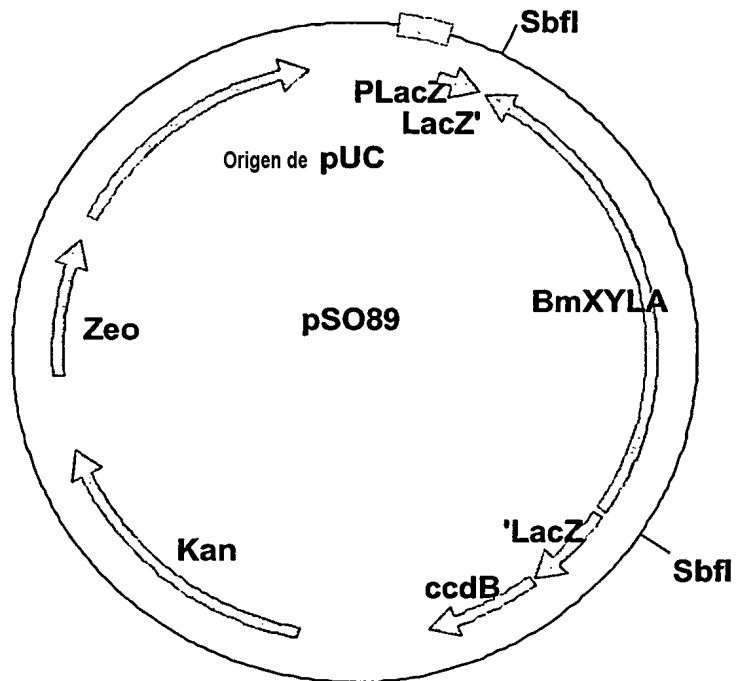


Fig. 38

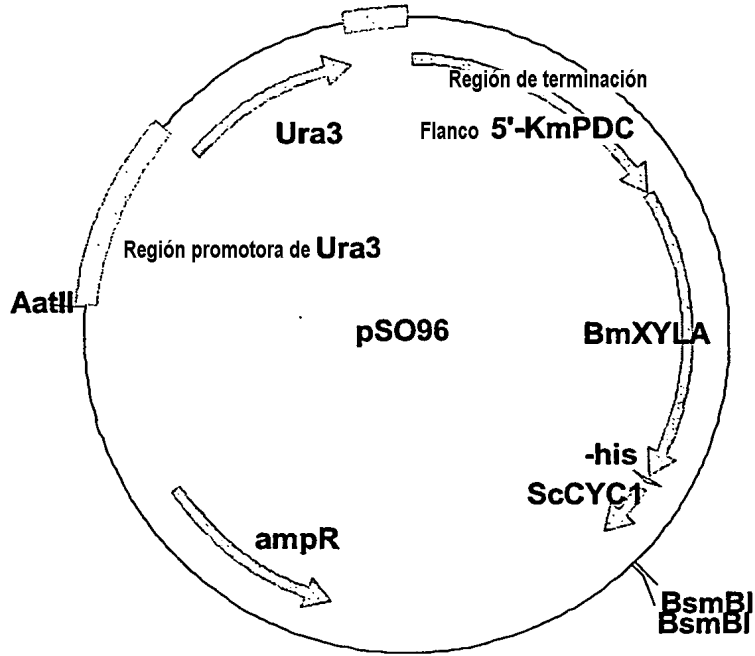


Fig. 39

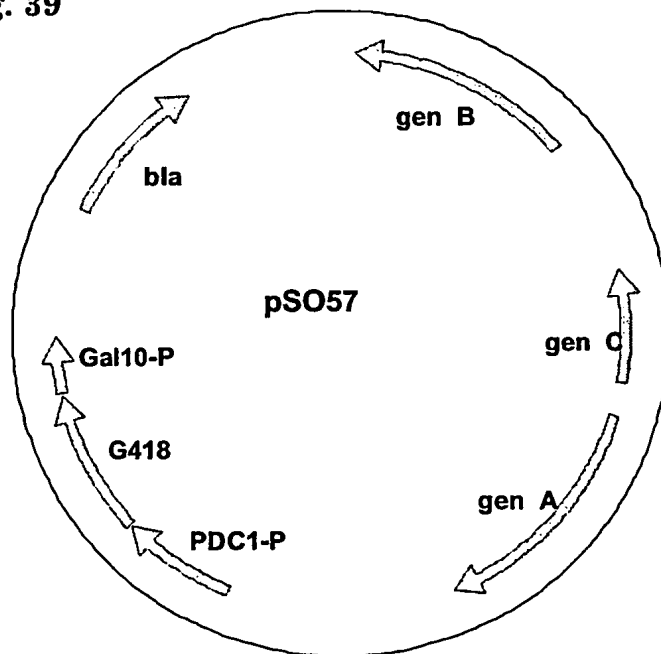


Fig. 40

