

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 399 297**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/81 (2006.01)
C07K 14/39 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2007 E 07847018 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2102348**

(54) Título: **Nuevo transportador de arabinosa específico procedente de la levadura PICHIA SITIPITIS y sus usos**

(30) Prioridad:

20.12.2006 DE 102006060381

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2013

(73) Titular/es:

BUTALCO GMBH (100.0%)
Mettlenstrasse 14
6363 Fürgen, CH

(72) Inventor/es:

**BOLES, ECKHARD y
KELLER, MARCO**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 399 297 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

Nuevo transportador de arabinosa específico procedente de la levadura *Pichia stipitis* y sus usos

1. Resumen

La presente invención se refiere a un polipéptido que presenta una nueva función de transporte de arabinosa específica, así como a ácidos nucleicos que codifican para el mismo. La invención se refiere además a células huésped, en particular cepas de levadura modificadas, que contienen los ácidos nucleicos codificantes y que expresan el polipéptido y que se integran funcionalmente en la membrana plasmática y que, por lo tanto, pueden acoger L-arabinosa. Con el uso de células huésped modificadas, que expresan otras proteínas de la ruta metabólica de la arabinosa, puede fermentarse arabinosa mediante estas células, en particular para dar etanol. Por lo tanto, la presente invención es significativa, entre otras cosas, en relación con la producción de productos bioquímicos a partir de biomasa, tal como por ejemplo bioetanol.

2. Antecedentes de la invención

La levadura de cerveza, de vino y de panadería *Saccharomyces cerevisiae* se usa ya desde hace siglos para la producción de pan, vino y cerveza debido a su propiedad de fermentar el azúcar para dar etanol y dióxido de carbono. En la biotecnología *S. cerevisiae* se usa, junto a la producción de proteínas heterólogas, sobre todo en la producción de etanol para fines industriales. El etanol se utiliza en numerosos sectores de la industria como sustrato de partida para síntesis. Debido a las existencias de petróleo cada vez más escasas, al precio del petróleo en aumento y a la demanda de gasolina continuamente creciente a nivel mundial, el etanol cobra cada vez más importancia como alternativa de combustible.

Para permitir una producción de bioetanol económica y eficaz se ofrece el uso de biomasa lignocelulósica, tal como por ejemplo paja, desechos de la industria de la madera y agrícola y la parte orgánica de la basura doméstica diaria, como sustrato de partida. Ésta es por un lado muy favorable y, por otro lado, existe en gran cantidad. Los tres componentes mayores de la lignocelulosa son lignina, celulosa y hemicelulosa. La hemicelulosa, después de la celulosa, el segundo polímero más frecuente, es un heteropolímero muy ramificado. Está compuesta por pentosas (L-arabinosa, D-xilosa), ácidos urónicos (ácido 4-O-etil-D-glucurónico, ácido D-galacturónico) y hexosas (D-manosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-glucosa) (véase la figura 1). La hemicelulosa, si bien puede hidrolizarse más fácilmente que la celulosa, en cambio presenta las pentosas L-arabinosa y D-xilosa, que normalmente no pueden convertirse por la levadura *S. cerevisiae*.

Para poder utilizar pentosas para fermentaciones, éstas deben llegar en primer lugar a la célula a través de la membrana plasmática. Aunque *S. cerevisiae* no puede metabolizar la D-xilosa, ésta puede alojarse en la célula. Sin embargo *S. cerevisiae* no tiene ningún transportador específico. El transporte tiene lugar con ayuda de los numerosos transportadores de hexosa. La afinidad de los transportadores hacia D-xilosa es en cambio claramente más baja que la afinidad hacia D-glucosa (Kotter y Ciriacy, 1993). En levaduras que pueden metabolizar D-xilosa, tales como por ejemplo *P. stipitis*, *C. shehatae* o *P. tannophilus* (Du Preez y col., 1986), existen tanto transportadores de baja afinidad no específicos, que transportan D-glucosa, como simportadores de protones de alta afinidad específicos sólo para D-xilosa (Hahn-Hagerdal y col., 2001).

En ensayos previos pudieron encontrarse algunas levaduras, tales como por ejemplo *Candida tropicalis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, que pueden fermentar L-arabinosa de forma natural o al menos asimilarla. Sin embargo, éstas no tienen la capacidad de fermentar la L-arabinosa para dar etanol por completo o presentan sólo un rendimiento de etanol muy bajo (Dien y col., 1996). También se sabe muy poco sobre la incorporación de L-arabinosa. En la levadura *C. shehatae* se parte de un simporte de protones (Lucas y Uden, 1986). En *S. cerevisiae* se conoce de la galactosa permeasa Gal2, que ésta transporta también la L-arabinosa similar en la estructura a la D-galactosa (Kou y col., 1970).

La fermentación alcohólica de pentosas en cepas de levadura de *S. cerevisiae* modificadas mediante biotecnología, recurriendo entre otros a distintos genes de la cepa de levadura *Pichia stipitis* para la modificación genética de *S. cerevisiae*, se describió en los últimos años sobre todo en relación con la fermentación de xilosa.. A este respecto la ingeniería genética se concentra sobre todo en la introducción de los genes para la asimilación de xilosa inicial a partir de *Pichia stipitis*, una levadura que fermenta xilosa en *S. cerevisiae*, es decir una levadura que se utiliza tradicionalmente en la producción de etanol hexosa (Jin y col. 2004).

Jeppson y col. (2006) describen la fermentación de xilosa mediante *S. cerevisiae* por medio de la introducción de una ruta metabólica de xilosa, que o bien es similar a la ruta metabólica en las levaduras *Pichia stipitis* y *Candida shehatae*, que usan naturalmente xilosa, o bien similar a la ruta metabólica bacteriana.

Katahira y col. (2006) describen hidrolizados de ácido sulfúrico de biomasa lignocelulósica, tal como astillas de madera, como material importante para la producción de bioetanol combustible. En este estudio se construyó una cepa de levadura recombinante que puede fermentar xilosa y celooligosacáridos. Para ello se integraron distintos genes en esta cepa de levadura, en concreto para la expresión intercelular de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa a partir de *Pichia stipitis* y xiluloquinasa a partir de *S. cerevisiae* así como para la presentación de

beta-glucosidasa a partir de *Aspergillus acleatus* sobre la superficie celular. Durante la fermentación de los hidrolizados de ácido sulfúrico de astillas de madera se fermentaron completamente después de 36 horas xilosa y celooligosacáridos mediante la cepa recombinante.

5 Pitkanen y col. (2005) describen la obtención y caracterización de aislados de quimiostato de xilosa de una cepa de *S. cerevisiae*, que sobreexpresa genes que codifican para xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis* y el gen, que codifica para la xiluloquinasa endógena. Los aislados se obtuvieron a partir de cultivos de quimiostato aeróbicos sobre xilosa como única o principal fuente de carbono. En condiciones aerobias sobre medio mínimo con 30 g/l de xilosa la tasa de crecimiento del aislado de quimiostato era 3 veces mayor que la de la cepa original ($0,15 \text{ h}^{-1}$ frente a $0,05 \text{ h}^{-1}$). La tasa de incorporación de xilosa se aumentó casi 2 veces. Las actividades de las encimas clave de la ruta metabólica de la pentosa fosfato (transacetolasa, transaldolasa) se aumentaron 2 veces, mientras que las concentraciones de sus sustratos (pentosa-5-fosfatos, sedoheptulosa-7-fosfato) se redujeron de manera correspondiente.

10 Becker y Boles (2003) describen la ingeniería genética y la selección de una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae*, que puede usar L-arabinosa para el crecimiento y fermentar para dar etanol. Esto fue posible mediante la sobreexpresión de una ruta metabólica de la L-arabinosa bacteriana, que consiste en AraA de *Bacillus subtilis* y AraB y AraD de *Escherichia coli* y sobreexpresión simultánea de la galactosa permeasa que transporta L-arabinosa en la cepa de levadura. El análisis molecular de la cepa seleccionada mostró que el requisito decisivo para un uso de L-arabinosa es una menor actividad de L-ribuloquinasa. Sin embargo, de esta cepa de levadura se informa, entre otras cosas, de un crecimiento muy lento. (Véase la figura 2)

15 20 Es decir, en el estado de la técnica existe la necesidad de transportadores de pentosa específicos, en particular transportadores de L-arabinosa, que permitan captar pentosas, en particular L-arabinosa de manera específica en células, tales como células de levadura, y por lo tanto favorecer la utilización y la fermentación de pentosas, en particular L-arabinosa.

25 Por lo tanto es objetivo de la presente invención proporcionar transportadores de pentosa específicos, tales como transportadores de L-arabinosa.

Este objetivo se alcanza mediante la invención, tal como se reivindica en las reivindicaciones.

El objetivo se alcanza según la invención mediante la provisión de polipéptidos que presentan una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*, y variantes y fragmentos de los mismos.

El polipéptido según la invención se selecciona del grupo de

- 30 a. un polipéptido, que es al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 % idéntico a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:1 y que presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*, y
b. un polipéptido, que es idéntico a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:1 y que presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*,

siendo la pentosa preferentemente arabinosa, en particular L-arabinosa.

35 De manera preferente el polipéptido según la invención comprende un fragmento de al menos 200 o 300 aminoácidos continuos según la SEQ ID NO:1. A este respecto un fragmento de este se caracteriza porque presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*.

40 En una forma de realización preferida un polipéptido según la invención comprende un fragmento de 502 aminoácidos, que corresponde a los primeros 502 aminoácidos según la SEQ ID NO: 1. Un fragmento de este tipo se caracteriza porque presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*.

De manera preferente el polipéptido según la invención es un polipéptido que es hasta al menos el 90 %, preferentemente el 95 %, más preferentemente hasta el 99 % idéntico a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:1 y que presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*.

45 Variantes de los polipéptidos según la invención pueden ser también aquéllos que presentan los cambios de aminoácidos conservativos o menores delecciones y/o inserciones, siempre que estas modificaciones no influyan esencialmente la función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*.

Los polipéptidos según la invención pueden comprender además secuencias de aminoácidos heterólogas. El propio experto puede seleccionar secuencias de aminoácidos heterólogas adecuadas según su aplicación o uso.

50 De manera preferente la pentosa es arabinosa, en particular L-arabinosa, de modo que un polipéptido según la invención presenta preferentemente una función de transporte de arabinosa *in vitro* y/o *in vivo*, en particular una función de transporte de L-arabinosa.

El polipéptido según la invención procede preferentemente de una levadura, preferentemente de *Pichia*, en particular *Pichia stipitis*.

El objetivo se alcanza además según la invención mediante la provisión de moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para un polipéptido según la invención.

De manera preferente una molécula de ácido nucleico según la invención es hasta al menos el 90 %, preferentemente el 95 % y más preferentemente el 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO:2 o 3.

Una molécula de ácido nucleico según la invención comprende secuencias de ácido nucleico de vector adicionales, preferentemente secuencias de vector de expresión. Secuencias de ácido nucleico de vector se seleccionan preferentemente de secuencias, que se comprenden por los vectores del grupo que consiste en YEpl24, p426HXT7-6HIS, p426Met25, pYES260, pYES263, pVTU260, pVTU263, pVTL260, pVTL263. Para realizaciones adicionales véanse las figuras 6A-E y el ejemplo 3.

Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden comprender además secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptidos heterólogos adicionales. El propio experto puede seleccionar secuencias de ácido nucleico heterólogas adecuadas, que codifican para polipéptidos heterólogos adicionales, según la aplicación o el uso. Entre ellas figuran por ejemplo secuencias de marcador de resistencia a antibióticos.

15 Las moléculas de ácido nucleico según la invención comprenden preferentemente ADNbC, ADNmC, PNA, CNA, ARN o ARNm o combinaciones de los mismos.

El objetivo se alcanza además según la invención mediante la provisión de células huésped que contienen al menos una molécula de ácido nucleico según la invención. Las células huésped según la invención expresan además preferentemente esta al menos una molécula de ácido nucleico según la invención.

20 Una célula huésped según la invención es en particular una célula de hongo y preferentemente una célula de levadura, tal como *Saccharomyces* sp., por ejemplo *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces* sp., por ejemplo *K. lactis*, *Hansenula* sp., por ejemplo *H. polymorpha*, *Pichia* sp., por ejemplo *P. pastoris*, *Yarrowia* sp., por ejemplo *Y. lipolytica*.

De manera preferente las células huésped según la invención contienen además moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas de la ruta metabólica de la arabinosa, en particular para L-ribuloquinasa, L-ribulosa-5-P 4-epimerasa, L-arabinosa-isomerasa.

25 A este respecto se trata preferentemente de proteínas de la ruta metabólica de la arabinosa bacteriana, en particular L-ribuloquinasa de *araB* de *E. coli*, L-ribulosa-5-P 4-epimerasa de *araD* de *E. coli* y L-arabinosa-isomerasa de *araA* de *B. subtilis*. Véanse también las figuras 2 y 3.

30 Células huésped especialmente preferidas de esta invención son células de la cepa MKY06-4P que se depositó en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares el 23 de agosto de 2006 con el número de depósito DSM 18544. Véase también la figura 3.

35 Una célula huésped preferida según esta invención es una célula de levadura que se modificó mediante la introducción y la expresión de los genes *araA* (L-arabinosa-isomerasa), *araB* (L-ribuloquinasa) y *araD* (L-ribulosa-5-P 4-epimerasa) y también sobreexpresa un gen *TAL1* (transaldolasa), tal se describe por los inventores en el documento EP 1 499 708 B1, y además de esto contienen al menos una molécula de ácido nucleico según la invención.

40 El objetivo se alcanza además según la invención mediante la provisión de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, que comprenden una parte inmunológicamente activa, que se une de manera selectiva a un polipéptido según la invención. En el estado de la técnica se conocen procedimientos para la generación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

45 El objetivo se alcanza además según la invención mediante procedimientos para la producción de un polipéptido según la invención. Un procedimiento de este tipo comprende cultivar una célula huésped según la invención en condiciones en las que se expresa una molécula de ácido nucleico según la invención. En el estado de la técnica se conocen procedimientos generales para la generación de polipéptidos por medio de cultivo celular.

50 El objetivo se alcanza además según la invención mediante un kit que comprende un compuesto, que se une de manera selectiva a un polipéptido según la invención, opcionalmente con adyuvantes adicionales e instrucciones de uso.

El compuesto es preferentemente una pentosa, tal como por ejemplo arabinosa, y en particular L-arabinosa, o un derivado de una pentosa de este tipo.

55 El objetivo se alcanza además según la invención mediante procedimientos para la identificación de un compuesto, que se une a un polipéptido según la invención y/o modula su actividad. Un procedimiento de este tipo comprende las siguientes etapas:

- Poner en contacto un polipéptido o una célula, que expresa un polipéptido según la invención, con un compuesto de prueba, y determinar, si el polipéptido se une al compuesto de prueba y, opcionalmente, determinar, si el compuesto de prueba modula la actividad del polipéptido.
- 5 El compuesto es preferentemente una pentosa, tal como por ejemplo arabinosa, y en particular L-arabinosa, o un derivado de una pentosa de este tipo.
- El objetivo se alcanza además según la invención mediante procedimientos para la modulación de la actividad de un polipéptido según la invención. Un procedimiento de este tipo comprende poner en contacto un polipéptido o una célula, que expresa un polipéptido según la invención, con un compuesto, que se une al polipéptido en una concentración suficiente para modular la actividad del polipéptido.
- 10 El compuesto es preferentemente una pentosa, tal como por ejemplo arabinosa, y en particular L-arabinosa, o un derivado de una pentosa de este tipo.
- El objetivo se alcanza además según la invención mediante procedimientos para la producción de bioetanol. Un procedimiento según la invención de este tipo comprende la expresión de una molécula de ácido nucleico según la invención en una célula huésped según la invención.
- 15 Los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y células huésped según la invención se usan en particular preferentemente para la producción de bioetanol. Para formas de realización preferidas se remite a la figura 8 y al ejemplo 4.
- 20 Los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y células huésped según la invención se usan además en particular preferentemente para la fermentación recombinante de biomaterial que contiene pentosa.
- 25 Genes específicos de *Pichia stipitis*, que aumentan de manera específica la incorporación de la pentosa L-arabinosa en *S. cerevisiae*, se aislaron con el uso de un banco de genes y se integraron en la cepa de levadura MKY06-3P, que entonces puede fermentar la L-arabinosa para dar etanol. La selección de los genes relevantes llevó a un nuevo transportador de L-arabinosa específico, cuya secuencia de nucleótidos y de proteína existe (véanse las SEQ ID NO: 1-4). Para ello se remite también a los ejemplos y las figuras.
- Debido a la especificidad de este nuevo transportador, puede mejorarse la tasa de incorporación para L-arabinosa tras la expresión en sistemas productores de etanol existentes, dado que, por un lado, a altas concentraciones de L-arabinosa se mejora la situación de concurrencia con respecto a la glucosa y, por otro lado, a menores concentraciones de L-arabinosa debido a una alta afinidad se hace más eficiente el transporte de L-arabinosa.
- 30 *Incorporación de L-arabinosa*
- Para que la pentosa L-arabinosa de *S. cerevisiae* pueda metabolizarse, debe incorporarse en primer lugar en la célula. Se conoce poco con respecto a esta incorporación. Hasta el momento no se conoce todavía en eucariotas ningún gen que codifique para transportadores de L-arabinosa específicos. Todos los transportadores de hexosa sometidos a prueba para la pentosa D-xilosa presentan una afinidad mucho mayor hacia D-glucosa que hacia D-xilosa. Lo mismo se supone para la L-arabinosa. De todas las cepas construidas hasta ahora que pueden aprovechar pentosas (D-xilosa o L-arabinosa), se notifica un crecimiento relativamente lento. Como motivo para ello se menciona sobre todo la lenta y escasa incorporación de las pentosas (Becker y Boles, 2003; Richard y col., 2002). En el caso de fermentaciones en una mezcla de azúcar, compuesta por D-glucosa y D-xilosa o D-glucosa y L-arabinosa, los azúcares no se convierten simultáneamente. Mediante la alta afinidad de los transportadores hacia D-glucosa se metaboliza ésta en primer lugar. Se produce un denominado desplazamiento de diauxia. Sólo después de haberse agotado la D-glucosa, se convierte la pentosa en una segunda fase de crecimiento claramente más lenta (Kuyper y col., 2005a; Kuyper y col., 2005b). Como explicación se menciona la falta de transportadores específicos para pentosas.
- 35 *Nuevo transportador de L-arabinosa específico a partir de P. stipitis*
- 40 45 Para aplicaciones industriales sería ideal si el microorganismo usado pudiera convertir de la forma más simultánea posible, todos los azúcares presentes en el medio (Zaldivar y col., 2001). Para conseguir esto, serían de gran utilidad transportadores específicos para cada tipo de azúcar. Especialmente para L-arabinosa no se conocía aún ninguno hasta ahora.
- 50 En esta invención se logra con un sistema de prueba (véanse los ejemplos), encontrar un gen de transportador de L-arabinosa específico a partir del genoma de *P. stipitis*. En los plásmidos pAraT1 y pAraT7 están localizados fragmentos del genoma de *P. stipitis*, que son responsables de un crecimiento específico en medio de L-arabinosa pero no de D-glucosa, D-mannosa o D-galactosa. El bajo crecimiento observado en D-galactosa no se provocó por los plásmidos pAraT1 o pAraT7. A este respecto se trataba sólo del crecimiento débil de EBY.VW4000, la cepa de partida del MKY06, que ya se notificó por Wieczorke y col. (1999). Pudo descartarse la posibilidad, de que el

crecimiento obtenido se provocara por una mutación genómica en MKY06. Tras una selección sobre la pérdida del plásmido del banco de genes de *P. stipitis* mediante la doble extensión en medio FOA ya no se determinó ningún crecimiento con nuevas extensiones en medio de L-arabinosa. Por lo tanto el crecimiento resultó de los plásmidos del banco de genes de *P. stipitis* (véanse los ejemplos). Pudo mostrarse que los plásmidos encontrados codifican para un transportador.

Con una búsqueda BLAST con el genoma de *Pichia stipitis* publicado recientemente (véase http://genome.jgipsf.org/euk_home.html) se mostró una coincidencia del 100 % con HGT2. HGT2 se anotó como transportador de glucosa de alta afinidad putativo debido a su alta homología con el transportador de glucosa de alta afinidad HGT1 de *Candida albicans*. Si se examina la secuencia en cuanto a los posibles dominios transmembrana, se obtienen 12 dominios transmembrana, lo que es típico de los transportadores. Por lo tanto, es sorprendente que se trate de un transportador de pentosa (transportador de arabinosa) y no de un transportador de hexosa.

Además había que vencer una pluralidad de obstáculos y dificultades experimentales para hallar y proporcionar el transportador según la invención, que se deducen en mayor detalle también a partir de los ejemplos y las figuras.

- En la cepa de partida EBY.VW4000 debían delecionarse en total 21 genes de transportador de monosacárido.
- Además en esta cepa debía sobreexpresarse a nivel del genoma *TAL1*.
- El establecimiento de las condiciones de crecimiento óptimas para la realización de la selección se configuran de manera muy difícil y que requiere mucho tiempo.
- En el caso del transportador según la invención se trata del primer transportador de arabinosa específico descrito de eucariotas
- Se trata de un transportador expresado de manera heteróloga e incorporado al mismo tiempo funcionalmente en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, lo que no es de esperar necesariamente.

Sobre las dificultades en cuanto a transportadores expresados de manera heteróloga existen algunos informes, véase para ello el capítulo 2 en "Buch Transmembrane Transporters" (Boles, 2002) y el artículo de Wieczorka y col., 2003.

Otra biomasa con cantidades significativas de arabinosa (fuente de los datos: U.S. Department of Energy <http://www.eere.energy.gov/biomass/progs/search1.cgi>):

Tipo de biomasa	L-Arabinosa [%]
Pasto varilla	3,66
Coirón grande	3,55
Festuca alta	3,19
Robinia	3
Rastrojo de maíz	2,69
Paja de trigo	2,35
Bagazo de caña de azúcar	2,06
Lespedeza oriental	1,75
Forraje de mijo	1,65

También para su aprovechamiento es de gran importancia el transportador de arabinosa según la invención.

Posibilidades de utilización de un transportador de arabinosa funcional en la levadura *S. cerevisiae* y al mismo tiempo específico son, por un lado, la producción de bioetanol y la producción de productos precursores de alta calidad para otras síntesis químicas.

La siguiente enumeración procede del estudio "Top Value Added Chemicals From Biomass" (véase www.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf). En este caso se clasificaron 30 productos químicos como especialmente valiosos, que pueden producirse a partir de biomasa.

Número de átomos de C	Mejores 30 candidatos
1	Hidrógeno, monóxido de carbono
2	
3	Glicerol, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido láctico, ácido malónico, ácido propiónico, serina
4	Acetoína, ácido aspártico, ácido fumárico, 3-hidroxibutirolactona, ácido málico, ácido succínico, treonina

(continuación)

Número de átomos de C	Mejores 30 candidatos	
	5	Arabitol, furfural, ácido glutámico, ácido itacónico, ácido levulínico, prolina, xilitol, ácido xilónico
	6	Ácido aconítico, citrato, ácido 2,5-furandicarboxílico, ácido glucárico, lisina, levoglucosano, sorbitol

Siempre que estos productos químicos se produzca a partir de lignocelulosa mediante bioconversión (por ejemplo fermentaciones con levaduras), es importante tener un transportador específico para la hemicelulosa arabinosa.

La presente invención se aclara adicionalmente en las siguientes figuras, secuencias y ejemplos, pero sin estar limitada a los mismos. Las referencias citadas se incorporan completamente al presente documento por referencia. En las secuencias y las figuras muestra:

la SEQ ID NO: 1 la secuencia de proteína del ORF de AraT,

la SEQ ID NO: 2 la secuencia del marco de lectura abierto (ORF) de AraT,

la SEQ ID NO: 3 la secuencia del marco de lectura abierto (ORF) de AraT en una forma con optimización de codones, y

la SEQ ID NO: 4 la secuencia del marco de lectura abierto (ORF) de AraT con 500 de promotor, ORF y 300 de terminador.

Figura 1. Composición de la biomasa.

La segunda hemicelulosa más frecuente es un polímero muy ramificado compuesto por pentosas, ácidos urónicos y hexosas. La hemicelulosa se compone en una gran proporción de las pentosas xilosa y arabinosa.

Figura 2. Esquema para el uso de L-arabinosa en *S. cerevisiae* recombinante mediante la integración de una L-ruta metabólica de la arabinosa bacteriana.

Figura 3. Construcción de la cepa de levadura según la invención MKY06-4P.

La cepa de partida para la construcción de la MKY06-4P fue la cepa de levadura EBY.VW4000, en la que estaban delecionados todos los genes de transportador de hexosa (*HXT*). En esta cepa se sobreexpresó el *TAL1* de transaldolasa endógena mediante el cambio del promotor nativo por el promotor de *HXT7* acortado (*HXT7-Prom*). Esto llevó a la cepa MKY06. En esta cepa se transformaron los plásmidos p423H7araABs^{re} (*araA*), p424H7araB^{re} (*araB*) y p425H7araD^{re} (*araD*) para el metabolismo de la arabinosa (=MKY06-3P). Adicionalmente se transformó también el plásmido p426H7-araT (*araT*), que codifica para el transportador de arabinosa según la invención de *Pichia stipitis* y que así se obtuvo la cepa MKY06-4P. El transportador se expresa y se incorpora de manera funcional en la membrana plasmática (*AraT*).

Figura 4. Extensión de la MKY06 con los plásmidos para el metabolismo de la L-arabinosa y los transportadores de L-arabinosa encontrados sobre diferentes fuentes de carbono.

En cada extensión se trataba del MKY06-3P y adicionalmente un plásmido del banco de genes YEpTW. Como control negativo (-) se transformó en lugar de un plásmido del banco de genes el p426HXT7-6HIS y como control positivo (+) el pH125re. 1: pAraT1, 6: pAraT6, 7: pAraT7, 8: pAraT8, 11: pAraT11, -: control negativo, +: control positivo.

A: medio 2 % de L-arabinosa

B: medio en cada caso 2 % de D-galactosa, D-glucosa o D-manosa

Todas las placas de medio SC se incubaron a 30 °C. La placa de L-arabinosa (A) muestra el crecimiento después de 9 y todas las demás placas (B) después de 2 días. Las colonias 1 y 7 crecen sobre L-arabinosa pero no sobre D-glucosa, D-manosa y sólo débilmente sobre D-galactosa.

Figura 5. Secuenciación del transportador de arabinosa.

El marco de lectura abierto completo del transportador según la invención se secuenció en las dos cadenas con zonas solapantes. La zona de terminador y promotor se secuenció en una sola cadena. Las flechas muestran las zonas de secuenciaciones individuales

Figura 6. Vectores usados y su construcción.

El plásmido de partida para la producción del banco de genes de *P. stipitis* fue el plásmido YEp24 (A). El plásmido pAraT1 (B) como también el plásmido pAraT7 se basan por lo tanto en el YEp24 y se diferencian sólo en el tamaño del inserto. El marco de lectura abierto (ORF) del transportador de arabinosa según la invención se amplificó por el pAraT1 y se clonó detrás del promotor de *HXT7* fuerte acortado del plásmido p426HXT7-

6HIS (C). En este caso se generó el plásmido p426H7-AraT (D), que tiene un marcador de uracilo. Otro plásmido de expresión posible es p426Met25 (E).

Figura 7. Crecimiento sobre arabinosa con el uso de un transportador de arabinosa específico.

Crecimiento del MKY06-3P, que contiene adicionalmente también el plásmido pH125^{re} o el plásmido p426H7-AraT (=MKY06-4P), en medio SM con A) 0,5 %, B) 1 % y C) 2 % de L-arabinosa en condiciones aerobias. Las cepas con los distintos plásmidos se cultivaron en medio SM con 1 % de L-arabinosa y se inocularon con una $D\text{O}_{600\text{nm}} = 0,2$ en 30 ml de medio SM con A) 0,5 %, B) 1 % y C) 2 % de L-arabinosa. La incubación tuvo lugar en 300 ml de matraces con agitación en condiciones aerobias a 30 °C. Varias veces al día se tomaron muestras para la determinación de la densidad óptica.

Figura 8. Formación de etano con el uso de un transportador de arabinosa específico. Se muestran los resultados de análisis de HPLC de la cepa BWY1 con los plásmidos p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re}, p425H7araD^{re} y p426H7-AraT en medio SFM con 1,7 % de L-arabinosa en condiciones semianaerobias.

Ejemplos

Métodos

1. Cepas y medios

- Bacterias

E. coli SURE (Stratagene)

Medio completo LB 1 % de Trypton, 0,5 % de extracto de levadura, 0,5 % de NaCl, pH 7,5 (véase Maniatis, 1982) Para la selección de una resistencia a antibióticos codificada por plásmido se añadió al medio, tras tratamiento en autoclave, ampicilina 40 µg/ml. Los medios nutritivos sólidos contenían adicionalmente 1,9 % de agar. El cultivo tuvo lugar a 37 °C.

- Levadura

Cepa EBY.VW4000

EBY.VW4000 (genotipo: *MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP*) (Wieczorke y col., 1999)

Cepa MKY06

MKY06 (genotipo: *MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-1 MAL2-8c SUC2 hxt1-17 gal2 stl1::loxP agt1::loxP mph2::loxP mph3::loxP PromTAL1::loxP-Prom-vkHXT7*, Descripción: EBY.VW4000 *PromTAL1::loxP-Prom-vkHXT7*)

Cepa MKY06-3P

MKY06-3P (genotipo: *MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-1 MAL2-8c SUC2 hxt1-17 gal2 stl1::loxP agt1::loxP mph2::loxP mph3::loxP PromTAL1::loxP-Prom-vkHXT7*, Descripción: EBY.VW4000 *PromTAL1::loxP-PromvkHXT7*); incluye los plásmidos p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re} y p425H7araD^{re}.

Cepa con el número de depósito DSM 18544

MKY06-4P (genotipo: *MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-1 MAL2-8c SUC2 hxt1-17 gal2 stl1::loxP agt1::loxP mph2::loxP mph3::loxP PromTAL1::loxP-Prom-vkHXT7*, Descripción: EBY.VW4000 *PromTAL1::loxP-PromvkHXT7*); incluye los plásmidos p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re}, p425H7araD^{re} y p426H7-AraT.

Cepa BWY1:

BWY1 se basa en la cepa JBY25 (genotipo: *MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1MAL2-8c SUC2 + mutaciones desconocidas para un mejor crecimiento sobre L-arabinosa*) (Becker y Boles, 2003); la cepa JBY25 se seleccionó adicionalmente y tiene también mutaciones adicionales para un crecimiento mejorado sobre L-arabinosa en condiciones de oxígeno limitadas (Wiedemann, 2005).

- Medio completo YEP

1 % de extracto de levadura, 2 % peptona bacteriológica, fuente de carbono en la concentración indicada en cada caso

- Medio selectivo completo sintético SC

0,67 % de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio, 0,5 % de sulfato de amonio, dihidrogenofosfato de potasio 20 mM, pH 6,3, disolución de aminoácido/nucleobase sin los

aminoácidos correspondientes para los marcadores de auxotrofia de los plásmidos usados, fuente de carbono en la concentración indicada en cada caso

- Medio selectivo mínimo sintético SM:

5 0,67 % de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio, 0,5 % de sulfato de amonio, dihidrogenofosfato de potasio 20 mM, pH 6,3, fuente de carbono en la concentración indicada en cada caso

- Medio de fermentación sintético (medio mineral) SFM (Verduyn y col., 1992), pH 5,0

Sales: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/l; KH_2PO_4 , 3 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l

10 Metales traza: EDTA, 15 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg/l; CuSO_4 , 0,192 mg/l; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 mg/l; H_3BO_3 , 1 mg/l; KI , 0,1mg/l

Vitaminas: biotina, 0,05 mg/l; ácido p-aminobenzoico, 0,2 mg/l; ácido nicotínico, 1 mg/l; pantotenato de calcio, 1 mg/l; piridoxina HCl, 1 mg/l; tiamina-HCl, 1 mg/l; minositol, 25 mg/l

15 Concentración de los aminoácidos y nucleobases en el medio completo sintético (Zimmermann, 1975): adenina (0,08 mM), arginina (0,22 mM), histidina (0,25 mM), isoleucina (0,44 mM), leucina (0,44 mM), lisina (0,35 mM), metionina (0,26 mM), fenilalanina (0,29 mM), treonina (0,48 mM), triptófano (0,19 mM), tirosina (0,34 mM), uracilo (0,44 mM) y valina (0,49 mM). Como fuentes de carbono se usaron L-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa, D-manosa y maltosa. Para la selección sobre la pérdida de un plásmido con marcadores de selección *URA3* se usaron placas de medio completo sintético, que además de uracilo contenían 5-FOA 1 mg/ml, que se añadió tras el tratamiento en autoclave (Boeke y col., 1984).

20 Los medios completos y selectivos sólidos contenían adicionalmente un 1,9 % de agar. El cultivo de las células de levadura tuvo lugar a 30 °C. El medio mineral sintético utilizado para las fermentaciones contenía sales, metales traza y vitaminas en las concentraciones enumeradas anteriormente y la fuente de carbono indicada. A partir de los metales traza y las vitaminas se preparó una disolución madre. La disolución de metales traza se sometió a autoclave (20 min, 121 °C) y se filtró de manera estéril la disolución de vitaminas. Ambas se almacenaron a 4 °C. Para la producción de la disolución de metales traza el valor de pH tuvo un papel decisivo e impidió la precipitación de componentes individuales. Los distintos metales traza debían disolverse completamente agua en el orden anterior uno tras otro. Después de cada adición debía ajustarse a 6,0 el valor de pH con KOH antes de que pudiera añadirse el siguiente metal traza. Al final se ajustó a 4,0 el valor de pH con HCl. Para la evitar la formación de espuma, se añadió al medio antiespumante 50 µl/l (Antifoam204, Sigma). En el caso de ensayos anaerobios se añadió al medio también 2,5 ml/l de una disolución de Tween 80-ergosterol tras el tratamiento en autoclave. Esto consiste en 16,8 g de Tween 80 y 0,4 g de ergosterol, que se llenaron hasta 50 ml con etanol y se disolvieron en el mismo. La disolución se filtró de manera estéril. Las sales, las cantidades correspondientes de disolución de metales traza y el antiespumante se trajeron en autoclave junto con el fermentador completo. La fuente de carbono se trató en autoclave por separado del resto del medio. Antes del tratamiento en autoclave se ajustó a 5,0 el pH en todos. La disolución de vitaminas estéril se añadió al medio después de enfriar.

2. Plásmidos

Plásmido	Fuente/Referencia	Descripción
p423H7araAB ^{re}	Becker y Boles, 2003	<i>araA</i> de <i>B. subtilis</i> en p423HXT7-His, reaislado a partir de JBY25-4M
p424H7araB ^{re}	Becker y Boles, 2003	<i>araB</i> de <i>E. coli</i> en p423HXT7-His; reaislado a partir de JBY25-4M, Mutación en <i>araB</i>
p425H7araD ^{re}	Becker y Boles, 2003	<i>araD</i> de <i>E. coli</i> en p425HXT7-His; reaislado a partir de JBY25-4M
p426HXT7-6HIS	Becker y Boles, 2003	plásmido 2µ para la sobreexpresión de genes y para la producción de proteínas de fusión con 6xHis-epítopo; Gen marcador <i>URA3</i> , promotor de <i>HXT7</i> acortado y terminador de <i>CYC1</i>
pHL125 ^{re}	Guldener y col., 1996	plásmido 2µ con el gen <i>GAL2</i> expresado detrás del promotor de <i>ADH1</i> , gen marcador <i>URA3</i> , reaislado a partir de JBY25-4M
p426H7-araT		plásmido 2µ con el <i>ARAT</i> de <i>Pichia stipitis</i> expresado detrás del promotor de <i>HXT7</i> acortado, gen marcador <i>URA3</i>

3. Banco de genes de *Pichia stipitis*

YEptW *Pichia stipitis*: banco de genes con fragmentos cromosómicos de *Pichia stipitis* en el plásmido de sobreexpresión YEplac24, gen marcador *URA3* (Weierstall y col., 1999)

4. Transformación

5 - Transformación de *S. cerevisiae*

La transformación de *S. cerevisiae* se realizó con el método de acetato de litio (Gietz y Woods, 2002). Para la selección de una resistencia a geneticina se incubaron las células tras la transformación durante 4 h a 30 °C en medio completo y a continuación se sembraron en placa sobre placas de medio que contiene G418.

- Transformación de *E. coli*

10 La transformación de las células de *E. coli* tuvo lugar mediante el método de electroporación (Dower y col., 1988; Wirth, 1993) por medio de un aparato Easyject prima de EQUIBO.

5. Preparación de ADN

- Aislamiento de ADN de plásmido a partir de *S. cerevisiae*

15 Las células de un cultivo de levadura estacionario (5 ml) se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en 100 µl de tampón 1 (tomado del "Plasmid Mini Kit"). Tras la adición de 200 µl de tampón 2 y 2/3 volúmenes de perlas de vidrio ($\varnothing = 0,45$ mm) se digirieron las células durante 8 min en un Vibrax (Janke y Kunkel, Vibrax-VXR) a 4 °C. El sobrenadante se mezcló con 150 µl de tampón 3 y se incubó durante 10 min sobre hielo. Despues de una centrifugación de 15 minutos a 10000 rpm se usó el sobrenadante y el ADN de plásmido se precipitó con 400 µl de isopropanol (-20 °C, 10 min). El ADN sedimentado mediante centrifugación (30 min, 13000 rpm) se lavó con etanol frío al 70 % y se llevó a 20 µl de agua. El ADN se utilizó a continuación para una transformación en *E. coli* o una amplificación de ADN por medio de PCR.

- Aislamiento de ADN de plásmido a partir de *E. coli*

El aislamiento de ADN de plásmido a partir de *E. coli* tuvo lugar con el "Plasmid Mini Kit" de la empresa Qiagen según las indicaciones del fabricante.

25 - Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN se mide mediante fotometría espectral en un intervalo de longitud de onda de 240-300 nm. Si la pureza del ADN, determinada mediante el cociente E260nm/E280nm se encuentra a 1,8, entonces la extinción E260nm = 1,0 corresponde a una concentración de ADN de 50 mg de ADNbc/ml (Maniatis, 1982).

6. Amplificación de ADN por medio de PCR

30 - Uso del sistema Expand™ High Fidelity

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tuvo lugar con el sistema "Expand™ High Fidelity PCR System" de la empresa Roche según las indicaciones del fabricante. Al ADN de plásmido o genómico a amplificar se le añadieron dNTPMix 0,2 mM, 1x tampón 2 (que contiene MgCl₂ 1,5 mM), 1 U de polimerasa y respectivamente 100 pmol del cebador de oligonucleótido correspondiente. La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Techne) o masterciclador (Eppendorf).

Para la amplificación del ADN se seleccionaron los siguientes ciclos de temperatura.

1. 1x 95 °C, 4 min de desnaturización del ADN
2. 18-35x 95 °C, 45-60 s de desnaturización del ADN
- 35 55-60 °C, 45-60 s de unión del cebador al ADN (hibridación)
- 40 72 °C, 1-3 min de síntesis de ADN (elongación)
3. 1x 72 °C, 4 min de síntesis de ADN (elongación)

Después de la primera etapa se añadió la polimerasa ("hot start PCR"). El número de etapas de síntesis, la temperatura de hibridación y el tiempo de elongación se adaptaron a las temperaturas de fusión específicas de los oligonucleótidos usados o al tamaño del producto esperado. Los productos de la PCR se examinaron mediante una electroforesis en gel de agarosa posterior y a continuación se purificaron.

- Purificación de ADN de productos de la PCR

La purificación de los productos de la PCR tuvo lugar con el kit "QIAquick PCR Purification Kit" de la empresa Qiagen según las indicaciones del fabricante.

- Separación mediante electroforesis en gel de fragmentos de ADN

La separación de fragmentos de ADN con un tamaño de 0,15-20 kb tuvo lugar en geles de agarosa al 1-4 %. Como tampón de gel y de disolvente se usó 1xtampón de TAE (Tris40 mM, ácido acético 40 mM, 2 mM EDTA) (Maniatis, 1982).

- 5 Como patrón sirvió o bien un ADN de fago lambda cortado con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII o bien la escala de ADN 2-Log (NEB). Las muestras de ADN se mezclaron antes de la aplicación con 1/10 volúmenes de marcador azul (1xtampón TAE, glicerina al 10 %, azul de bromofenol al 0,004 %). Despues de la separación se incubaron los geles en un baño de bromuro de etidio y se hicieron visibles los fragmentos de ADN mediante irradiación con luz UV (254 nm).

- Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

- 10 El fragmento de ADN deseado se cortó a partir del gel de agarosa-TAE bajo luz UV de onda larga (366 nm) y se aisló con el kit "QIAex II Gel Extraction Kit" o el kit "QIAquick Gel Extraction Kit" de la empresa Qiagen según las indicaciones del fabricante.

7. Modificación enzimática de ADN

- Restricción de ADN

- 15 Escisiones específicas de secuencia del ADN con endonucleasas de restricción se realizaron en las condiciones de incubación recomendadas por el fabricante durante 2-3 horas con 2-5 U de enzima por mg de ADN.

8. Análisis de HPLC

- 20 Las muestras tomadas en los ensayos se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm para sedimentar las células de levadura. El sobrenadante se retiró y se congeló inmediatamente a -20 °C. Para la precipitación de proteínas se añadió posteriormente ácido sulfosalicílico al 50 %, se mezcló y se separó por centrifugación durante 30 min a 13000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se retiró, a partir del mismo se produjo una dilución 1/10 con agua y se utilizó para los análisis de HPLC. Como patrones para las mediciones sirvieron muestras con D-glucosa, L-arabinosa y etanol, que se utilizaron en concentraciones del 0,1 % p/p, 0,5 % p/p y 1,0 % p/p. La concentración de azúcar y la concentración de etanol se midieron por medio de BioLC (Dionex). En la medición se usó el automuestreador "AS50", el horno de columna "TCC-100", la bomba de gradiente "GS50" (todos de Dionex) y el detector RI "RI-101" (Shodex). Como columna se usó la VA 300/7.7 Nucleogel Sugar 810H (Macherey-Nagel) con ácido sulfúrico al 20 % como disolvente (0,6 ml/min). Para la evaluación de los datos de análisis se usó el programa Chromeleon™ (Versión 6.50, Dionex).

Ejemplo 1: Construcción de un sistema de ensayo para el examen de transportadores de L-arabinosa

A) Construcción del MKY06

- 30 En la cepa de levadura EBY.VW4000 se delecionaron todos los genes de la familia de transportadores de hexosa y adicionalmente se delecionaron tres genes de la familia de transportadores de maltosa. Esta cepa creció sobre medio de maltosa no modificado, pero ya no podía crecer sobre glucosa, fructosa y manosa y sólo creció muy débilmente sobre galactosa (Wieczorka y col., 1999). Dado que todos los transportadores de hexosa están 35 delecionados, puede deducirse que la cepa tampoco puede acoger ya más L-arabinosa y es por lo tanto adecuada para ensayos de transportador de L-arabinosa.

- 40 En ensayos anteriores (véase Becker y Boles, 2003) se había mostrado que además de una ruta metabólica de la L-arabinosa funcional también era necesaria una actividad aumentada de la transaldolasa para el uso de L-arabinosa. Por este motivo, mediante el cambio del promotor endógeno de *TAL1* en EBY.VW4000 por el promotor de *HXT7* acortado, se sobreexpresó *TAL1*. Esta cepa se denominó MKY06 y está prevista para, con los plásmidos para el metabolismo de la L-arabinosa y un transportador, que puede transportar la L-arabinosa, crecer sobre esta fuente de carbono.

B) Introducción de la ruta metabólica de la L-arabinosa

- 45 La cepa MKY06 se transformó con los plásmidos p423H7araAB^{rE}, p424H7araB^{rE} y p425H7araD^{rE} (=MKY06-3P), para que obtuviera la capacidad del uso de L-arabinosa. La transformación con los tres plásmidos tuvo lugar simultáneamente. Los transformantes se sembraron en placa sobre medio SC con el 2 % de maltosa. En una transformación adicional se transformaron como control positivo además del transportador Gal2, conocido como L-arabinosa y como control negativo el plásmido vacío p426HXT7-6HIS y de nuevo se sembraron en placa sobre placas de medio que contiene maltosa. El control positivo, que contiene un transportador de L-arabinosa y los tres plásmidos para el uso de L-arabinosa y sobreexpresa la transaldolasa, debería poder crecer sobre L-arabinosa. El control negativo no debería mostrar ningún crecimiento debido a la falta de transportador. Esto se sometió a ensayo.

C) Examen del sistema de ensayo

Para poder usar adicionalmente el sistema de ensayo construido, tuvieron que examinarse en primer lugar el control

positivo y el control negativo con respecto a su crecimiento. Varias colonias de los transformantes obtenidos sobre las placas de SC con el 2 % de maltosa se retiraron con un bucle de inoculación estéril y se extendieron sobre placas de SC con el 2 % de L-arabinosa y se incubaron a 30 °C durante diez días. El control positivo mostró, después de este tiempo, un claro crecimiento y el control negativo, tal como se esperaba, ningún crecimiento.

- 5 El comportamiento de crecimiento se examinó asimismo en medio líquido con el 2 % de maltosa o el 2 % de L-arabinosa. Para ello se realizaron cultivos previos con las fuentes de carbono correspondientes (maltosa o L-arabinosa) en condiciones aerobias a 30 °C. Después de alcanzar la fase exponencial tardía se usaron estos cultivos previos para inocular 30 ml del mismo medio con una $D_{600\text{nm}}=0,2$ inicial. Dado que el control negativo no crecía sobre placas de medio que contiene L-arabinosa, a partir del cultivo previo con el 2 % maltosa partiendo de 30 ml de medio SC se inoculó con el 2 % de L-arabinosa. El comportamiento de crecimiento se siguió a lo largo de varios días mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm. En medio de maltosa, el control positivo y el control negativo mostraron, tal como se esperaba, un crecimiento idéntico con una tasa de crecimiento de 0,197 h⁻¹. En el crecimiento de L-arabinosa se mostró, precisamente como ya en el caso de los ensayos con las placas de medio de L-arabinosa, sólo se encontró crecimiento en el control positivo ($\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$), que todavía presentaba el transportador Gal2 con respecto al control negativo. El bajo crecimiento al inicio del control negativo puede explicarse porque las células antes de la reinoculación de maltosa sobre medio que contiene L-arabinosa no se lavaron. Además las reservas de glicógeno de la levadura permiten también un ligero crecimiento.
- 10
- 15
- 20

Por lo tanto, este sistema de ensayo era funcional y podía utilizarse para el examen de transportadores de L-arabinosa. Como comparación sirvió en este caso siempre el control positivo y el control negativo mencionados en el presente documento.

Ejemplo 2 Selección con un banco de genes de *Pichia stipitis*

El sistema de ensayo se usó ahora para buscar, en un banco de genes de *Pichia stipitis*, una de las levaduras que pueden usar L-arabinosa, transportadores posibles de genes de L-arabinosa.

A) Realización de la selección

- 25 El banco de genes usado en este caso YEpTW se produjo a partir de la cepa de *Pichia stipitis* CBS5774. El ADN cromosómico se digirió parcialmente con la endonucleasa de restricción Sau3A parcialmente y se ligó en el vector YEp24 linealizado con *BamHI* (Weierstall y col., 1999).
- 30 El banco de genes presentaba precisamente como el plásmido pHL125^{re} un marcador de auxotrofia de uracilo. El banco de genes YEpTW se transformó en la cepa MKY06-3P y se extendió sobre medio SC con el 2 % de maltosa. Las colonias obtenidas tras tres días a 30 °C se replicaron en placa sobre placas de medio SC con el 2 % L-arabinosa. Después de 10 días se buscaron colonias que mostraban crecimiento de L-arabinosa. El crecimiento era sólo posible cuando el plásmido del banco de genes codifica para un transportador, que podía transportar L-arabinosa.

- 35 Para poder descartar mutaciones genómicas que pudieran ser responsables del crecimiento, se extendieron las colonias encontradas sobre medio completo con 5-FOA. De esta manera se seleccionó sobre la pérdida del plásmido del banco de genes. Estas colonias de la placa de 5-FOA ya no podían crecer con la nueva extensión sobre medio de L-arabinosa. Por lo tanto pudo descartarse una mutación genómica como causa para el crecimiento. Las colonias encontradas extendieron también sobre otras fuentes de carbono, para someter a prueba el espectro del sustrato.

B) Comportamiento de crecimiento

- 40 De las más de 30000 colonias replicadas en placa se extendieron de nuevo sobre placas de L-arabinosa las once colonias encontradas en este aso que mostraron un ligero crecimiento. En este caso, en cambio sólo cinco colonias mostraron de nuevo crecimiento sobre L-arabinosa. Se trataba en este caso de la cepa MKY06-3P, que contenía adicionalmente también el plásmido pAra1, pAraT6, pAraT7, pAraT8 o pAraT11 del banco de genes YEpTW (véase la figura 4). La MKY06-3P mostró el crecimiento más intenso con el AraT11. El resto crecieron más débilmente en comparación con el control positivo. En cambio, debe considerarse en este caso que el *GAL2* se sobreexpresó en el control positivo por un promotor fuerte y los genes sobre los plásmidos del banco de genes presentaban su promotor nativo. Son de especial interés los plásmidos pAraT1 y pAraT7, dado que éstos sólo median el crecimiento sobre medio de L-arabinosa. Éstos no mostraron ningún crecimiento sobre D-glucosa y sobre D-manosa. Sobre D-galactosa únicamente el pAraT1 provocó un ligero crecimiento. El crecimiento del pAraT7 sobre D-galactosa correspondía al crecimiento débil del control negativo (véase la figura 4). Éste se notificó ya anteriormente para la cepa de partida del MKY06, la EBY.VW4000 (Wieczorka y col., 1999).

- 45
- 50
- 55
- Las colonias con el pAraT6, pAraT7 y pAraT11 se cultivaron en medio SC líquido con el 2 % de L-arabinosa y a partir de ello se prepararon cultivos de glicerina, que se almacena para ensayos posteriores a -70 °C. Con los plásmidos pAraT1 y pAraT7 se trabajó adicionalmente y se examinó el comportamiento de crecimiento de las cepas en medio líquido. En medio SC con el 2 % de maltosa se comportaba el MKY06-3P, que contenía adicionalmente el pAraT1 o pAraT7, de forma idéntica al control positivo (adicionalmente también pHL125^{re}) y el control negativo

(adicionalmente también p426HXT7-6HIS). Las tasas de crecimientos ascendieron a $0,197 \text{ h}^{-1}$.

Sobre medio SC con el 2 % de L-arabinosa se mostraron diferencias. El control negativo (p426HXT7-6HIS) no mostró ningún crecimiento sobre este medio. El bajo crecimiento al inicio resultó de la etapa de lavado ausente en la reinoculación a partir del cultivo previo sobre medio de maltosa -medio en el cultivo principal en medio de L-arabinosa. Ambos transportadores de L-arabinosa encontrados se comportaban de forma similar. En la tasa de crecimiento ($\mu = 0,087 \text{ h}^{-1}$) como también en la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ máxima no hubo ninguna diferencia entre el MKY06-3P con el plásmido pAraT1 o el pAraT7. Si se compara el comportamiento de crecimiento de los dos nuevos transportadores con el control positivo (pHL125^{re}, $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$) entonces se mostró una tasa de crecimiento algo menor y una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ menor.

10 C) Aislamiento de los transportadores de L-arabinosa encontrados

Para poder analizar los transportadores encontrados en el plano genómico, debían aislarse en primer lugar los plásmidos del banco de genes de nuevo a partir de la levadura. En este caso, había que considerar que la cepa MKY06 no contiene sólo el plásmido del banco de genes YEpTW, que codifica para el transportador buscado, sino que, al mismo tiempo, también se producen los tres plásmidos para el metabolismo de L-arabinosa (p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re}, p425H7araD^{re}) y que el plásmido p423H7araABs^{re} se produce en un número mucho mayor en las células, que los tres plásmidos restantes. Dado que los plásmidos del banco de genes YEpTW presentaban un marcador de auxotrofia de uracilo, se inocularon las células a partir de las placas de L-arabinosa en medio líquido de maltosa sin uracilo (ura). Tras alcanzar la fase estacionaria se reincubaron las mismas en medio de maltosa-ura reciente medio y se cultivaron de nuevo. A este respecto se cultivaron las células con los cuatro plásmidos cinco veces en medio líquido de maltosa-ura hasta la fase estacionaria. El objetivo de ello era un enriquecimiento del plásmido pAraT1 o pAraT7. De estos dos cultivos se prepararon extensiones de separación sobre placas de medio de maltosa-ura. Las colonias que se generaron se replicaron en placa sobre otras placas de maltosa y se incubaron durante dos días a 30°C . Estas placas no contenían el aminoácido correspondiente para el marcador de auxotrofia de uno de los otros tres plásmidos (histidina para p423H7araABs^{re}, triptófano para p424H7araB^{re} o leucina para p425H7araD^{re}). Estas placas de replicación se compararon con las placas de maltosa-ura. Las colonias, que sólo crecieron sobre la placa de maltosa-ura, se seleccionaron. Éstas presentaban sólo todavía el plásmido pAraT1 o pAraT7. Los plásmidos se aislaron a partir de levadura. Después se amplificaron los plásmidos en *E. coli*, y tras el aislamiento a partir de *E. coli* se caracterizaron con ayuda de un análisis de restricción. Como enzimas de restricción se usaron Ncol y Nhel. Ncol corta sólo en el gen marcador *URA3*. Cuando se trata del plásmido buscado del banco de genes, entonces se genera un gran fragmento de 934 pb.

Ejemplo 3 Caracterización del nuevo transportador de arabinosa (araT)

A) Secuenciación

Se secuenciaron los fragmentos cromosómicos de *P. stipitis* localizados en los plásmidos encontrados en el ejemplo 2 pAraT1 y pAraT7.

35 El ORF completo del transportador encontrado se secuenció en las dos cadenas y con zonas solapantes. La zona de promotor y de terminador se secuenció en una sola cadena (véase la figura 5). Las flechas muestran las zonas de secuenciaciones individuales.

40 En la secuenciación se mostró que los dos plásmidos pAraT1 y pAraT7 contienen fragmentos solapantes del mismo gen. Se trata de uno y el mismo transportador y no de dos genes de transportador distintos. El plásmido pAraT1 presenta un inserto con aproximadamente 5 kb; contiene los marcos de lectura abiertos (ORF) completos del AraT, que se compone de 1629 bases y en consecuencia 542 aminoácidos (más el codón de terminación). Adicionalmente también secuencias de promotor y de terminador. El plásmido pAraT7 presenta un inserto que es de aproximadamente 3 kb de tamaño; no contiene el ORF completo del AraT, sino sólo las primeras 1507 bases. Este fragmento era en cambio, en su lugar, funcional.

45 En una búsqueda de BLAST con el genoma recién publicado de *Pichia stipitis* (véase http://genome.jgipsf.org/euk_home.html) se mostró una coincidencia del 100 % con HGT2. HGT2 se anotó debido a su alta homología con transportadores de glucosa HGT1 de alta afinidad de *Candida albicans* como transportadores de glucosa de alta afinidad putativos. Cuando se examina la secuencia con respecto a los posibles dominios transmembrana, se obtienen 12 dominios transmembrana, lo que es típico de los transportadores.

50 B) Ejemplos de vectores para el AraT

El plásmido de partida para la producción del banco de genes fue el plásmido YEp24. El plásmido pAraT1 como también el plásmido pAraT7 se basan por lo tanto en el YEp24 y se diferencian sólo en el tamaño del inserto. En el caso del vector YEp24 se trata de un plásmido episómico.

55 El marco de lectura abierto (ORF) del transportador de arabinosa encontrado se amplificó por el pAraT1 y se clonó detrás del promotor de *HXT7* intenso acortado del plásmido p426HXT7-6HIS. A este respecto se generó el plásmido p426H7-AraT, que presenta un marcador de uracilo.

Otro plásmido de expresión posible es p426Met25. Para tipos de vectores, véanse las figuras 6A a 6E.

Otros vectores de expresión posibles son pYES260, pYES263, pVTU260, pVTU263, pVTL260 y pVTL263. Datos en mayor detalle para estos vectores se encuentran en http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/km_expr.html.

5 C) Crecimiento en función de la concentración de L-arabinosa en el medio

El crecimiento de la cepa MKY06-4P se examinó en condiciones aerobias en función de la concentración de L-arabinosa en el medio. Como comparación se usó la cepa MKY06-3P, que contenía adicionalmente también el plásmido pHL125^{re} o p426HXT7-6HIS.

10 Las cepas con los distintos plásmidos se cultivaron en medio SM con el 1 % de L-arabinosa y se inocularon con una $DO_{600nm} = 0,2$ en 30 ml de medio SM con el 0,5 %, el 1 % o el 2 % de L-arabinosa. La incubación tuvo lugar en 300 ml de matraz con agitación en condiciones aerobias a 30 °C. Varias veces al día se tomaron muestras para la determinación de la densidad óptica.

15 Los resultados se muestran en las figuras 7A a 7C. La cepa MKY06-4P crece en las 3 condiciones más rápidamente que la cepa de comparación MKY06-3P; que contiene también el plásmido pHL125^{re}. Se muestra al 0,5 % de L-arabinosa (figura 7A) una clara ventaja del p426H7-AraT frente al pHL125^{re}. La cepa crece claramente más rápido y también hasta una densidad óptica mayor. También al 1 % de L-arabinosa (figura 7B) crece la cepa con el p426H7-AraT más rápido que la cepa de comparación. En la densidad óptica alcanzada al final del crecimiento no se muestra sin embargo ninguna diferencia. También a una concentración de L-arabinosa del 2 % (figura 7C) crece la cepa con el p426H7-AraT más rápidamente que la cepa de comparación con el pHL125^{re}, que en cambio a esta concentración se alcanza una mayor densidad óptica al final del crecimiento.

20 Con ello se muestra que el sistema de incorporación de L-arabinosa según la invención permite usar L-arabionsa de manera esencialmente más eficiente en las células de *S. cerevisiae* recombinantes.

Ejemplo 4 Uso del nuevo transportador de arabinosa (araT) para la formación de etanol

25 En la figura 8 se muestran los resultados de análisis de HPLC de la cepa BWY1 con los plásmidos p423H7araABs^{re}, p424H7araB^{re}, p425H7araD^{re} y adicionalmente el p426H7-AraT o como comparación el pHL125^{re} en medio SFM con el 1,7 % de L-arabinosa en condiciones semianaerobias.

30 Las cepas se cultivaron de manera aerobia en el mismo medio hasta una densidad óptica elevada. Las células se separaron por centrifugación y se usaron para la inoculación de ensayos de fermentación semianaerobios. Ya después de aproximadamente 25 horas, comienza en ambas cepas la producción de etanol. En la cepa que contiene el plásmido p426H7-AraT puede establecerse una mayor producción de etanol al inicio. Por otro lado, la concentración de arabinosa disminuye más intensamente al final del ensayo en células con el p426H7-AraT que en el pHL125^{re}, lo que indica que en este caso una mayor afinidad del AraT lleva a una fermentación mejorada de bajas concentraciones de arabionsa.

Bibliografía

- 35 Becker, J. y Boles, E. (2003) A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-Arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol* 69(7), 4144-50.
- Boeke, J.D., LaCroute, F. y Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoroorotic acid resistance. *Mol Gen Genet* 197(2), 345-6.
- Boles E. (2002) en "Transmembrane Transporters", Editor Michael W. Quick, WILEY-LISS, 19-36.
- 40 Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. (2000) Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dien, B.S., Kurtzman, C.P., Saha, B.C. y Bothast, R.J. (1996) Screening for L-arabinose fermenting yeasts. *Appl Biochem Biotechnol* 57-58, 233-42.
- 45 Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16(13), 6127-45.
- Du Preez, J.C., Bosch, M. und Prior, B.A. (1986) Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* - effects pf pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme Microb Technol* 8(360-364).
- Gietz, R.D. y Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/singlestranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96. Hahn-Hagerdal, B., Wahlbom, C.F., Gardonyi, M., van Zyl, W.H., Cordero Otero, R.R. y Jonsson, L.J. (2001) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 73, 53-84.

- Jeppsson M, Bengtsson O, Franke K, Lee H, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. (2006) The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K(M) for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 93(4):665-73.
- 5 Jin YS, Jeffries TW. (2004) Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 6(3):229-38.
- Katahira S, Mizuike A, Fukuda H, Kondo A. (2006) Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and celooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72(6):1136-43.
- 10 Kotter, P. y Ciriacy, M. (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 776-783.
- Kou, S.C., Christensen, M.S. y Cirillo, V.P. (1970) Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Characteristics of galactose uptake and exchange in galactokinaseless cells. *J Bacteriol* 103(3), 671-8.
- 15 Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (2005b) Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res* 5(10), 925-34.
- Kuyper, M., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (2004) Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Res* 4(6), 655-64.
- 20 Lucas, C. y Uden, N.v. (1986) Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23, 491-495.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor.
- 25 Pitkanen JP, Rintala E, Aristidou A, Ruohonen L, Penttila M. (2005) Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 67(6):827-37.
- Richard, P., Putkonen, M., Vaananen, R., Londesborough, J. y Penttila, M. (2002) The missing link in the fungal L-arabinose catabolic pathway, identification of the L-xylulose reductase gene. *Biochemistry* 41(20), 6432-7.
- 30 Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A. y Van Dijken, J.P. (1992) Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8(7), 501-17.
- Weierstall, T., Hollenberg, C.P. y Boles, E. (1999) Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Mol Microbiol* 31(3), 871-83.
- 35 Wieczorka, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. y Boles, E. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 464(3), 123-8.
- Wiedemann, B. (2005) Molekulargenetische und physiologische Charakterisierung eines rekombinanten Pentosevergärenden Hefestammes. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- 40 Wirth, R. (1993) Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA. *Forum Mikrobiologie* 11(507-515).
- Zaldivar, J., Nielsen, J. y Olsson, L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* 56(1-2), 17-34.
- Zimmermann, F.K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 31(2), 71-86.

LISTA DE SECUENCIAS

- 45 <110> Johann Wolfgang Goethe-Universität
 <120> Nuevo transportador de arabinosa específico procedente de la levadura *Pichia stipitis* y sus usos
 <130> FB21618
 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 542

<212> PRT

5 <213> *Pichia stipitis*

<400> 1

Met	Ser	Tyr	Glu	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Pro	Ala	Leu	Lys	Phe	Arg	Thr
1															15

Phe	Leu	Asp	Arg	Leu	Pro	Asn	Ile	Tyr	Asn	Val	Tyr	Ile	Ile	Ala	Ser
															30
20															

Ile	Ser	Cys	Ile	Ser	Gly	Met	Met	Phe	Gly	Phe	Asp	Ile	Ser	Ser	Met
35															45

Ser	Ala	Phe	Ile	Gly	Glu	Asp	Asp	Tyr	Lys	Asn	Phe	Phe	Asn	Asn	Pro
50															60

Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Gly	Phe	Ile	Thr	Ser	Cys	Met	Ala	Leu	Gly	Ser
65															80

Phe	Phe	Gly	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Phe	Ile	Ser	Glu	Pro	Phe	Gly	Arg
85															95

Arg	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Ser	Phe	Phe	Trp	Met	Val	Gly	Ala	Ala
100															110

Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Gln	Asn	Arg	Ala	Gln	Leu	Met	Ile	Gly	Arg	Ile
115															125

Ile	Ala	Gly	Phe	Gly	Val	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	Val	Ala	Pro	Val	Tyr
130															140

Gly	Ser	Glu	Leu	Ala	Pro	Arg	Lys	Ile	Arg	Gly	Phe	Val	Gly	Gly	Ile
145															160

Phe	Gln	Phe	Cys	Val	Thr	Leu	Gly	Ile	Leu	Ile	Met	Phe	Tyr	Ile	Cys
165															175

ES 2 399 297 T3

Tyr Gly Leu His Phe Ile Asn Gly Val Gly Ser Phe Arg Ile Ala Trp
180 185 190

Gly Leu Gln Ile Val Pro Gly Leu Val Leu Phe Val Gly Cys Phe Phe
195 200 205

Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ala Lys His Gly Tyr Trp Asp Glu
210 215 220

Ala Glu Phe Ile Val Ala Gln Ile Gln Ala Lys Gly Asn Arg Glu Asp
225 230 235 240

Pro Asp Val Leu Ile Glu Ile Ser Glu Ile Lys Asp Gln Ile Leu Ile
245 250 255

Glu Glu Asn Leu Lys Ser Phe Gly Tyr Val Asp Leu Phe Thr Lys Lys
260 265 270

Tyr Ile Arg Arg Thr Leu Thr Ala Ile Phe Ala Gln Ile Trp Gln Gln
275 280 285

Leu Thr Gly Met Asn Val Met Met Tyr Tyr Ile Val Tyr Ile Phe Asn
290 295 300

Met Ala Gly Tyr Ser Asn Asn Ala Asn Leu Val Ala Ser Ser Ile Gln
305 310 315 320

Tyr Val Leu Asn Thr Ala Ala Thr Val Pro Ala Leu Phe Leu Met Asp
325 330 335

Tyr Ile Gly Arg Arg Arg Leu Leu Ile Gly Gly Ala Ile Met Met Met
340 345 350

Ile Phe Gln Phe Gly Val Ala Gly Ile Leu Gly Lys Tyr Ser Val Pro
355 360 365

Val Pro Gly Gly Leu Pro Gly Asn Pro Thr Val Thr Ile Gln Ile Pro
370 375 380

Glu Asp Asn Lys Ser Ala Ala Arg Gly Val Ile Ala Cys Cys Tyr Leu
385 390 395 400

Phe Val Val Ser Phe Ala Leu Ser Trp Gly Val Gly Ile Trp Val Tyr
405 410 415

Cys Ser Glu Val Trp Gly Asp Ser Ala Ser Arg Gln Arg Gly Ala Ala
420 425 430

ES 2 399 297 T3

Val Ser Thr Ala Ala Asn Trp Ile Leu Asn Phe Ala Ile Ala Met Tyr
435 440 445

Thr Pro Ser Ser Phe Lys Asn Ile Thr Trp Lys Thr Tyr Ile Ile Tyr
450 455 460

Ala Val Phe Cys Leu Val Met Ala Ile His Val Tyr Phe Gly Phe Pro
465 470 475 480

Glu Thr Lys Gly Lys Arg Leu Glu Glu Val Gly Gln Met Trp Asp Glu
485 490 495

Asn Val Pro Ala Trp Arg Ser Ser Ser Trp Gln Pro Thr Val Pro Leu
500 505 510

Leu Ser Asp Ala Asp Leu Ala His Lys Met Asp Val Ser His Lys Glu
515 520 525

Glu Gln Ser Pro Asp Ala Glu Ser Ser Ser Glu Glu Lys Pro
530 535 540

<210> 2
<211> 1629

<212> ADN

5 <213> *Pichia stipitis*

<400> 2

atgagctacg aagataaaact cggtcaacct gccttgaagt tcaggaccctt cttggacaga	60
cttccaaaca tttacaatgt gtacatttattt gcatcttattt cctgtatttc aggtatgtatg	120
ttcggttttgc atatttcattc tatgtctgct tttataggtt aagatgacta caagaacttt	180
ttcaataatc caggctcaga catccaagggt tttatcactt cctgtatggc ttttaggttct	240
ttcttcgggtt ccatagtctc ttccatttccatt tccgaaccat ttggtagaaag agcatccttg	300
ttgttgtt cattttctg gatggtcggt gctgctgtac aatcatcttc tcaaaaacaga	360
gcccaatttga tgatcgacg tatcatcgct ggtttcgggtt ttgggtttgg ttcttctgtt	420
gctccagttt acgggtccga attggctcca agaaagatta gaggtttgtt tggtggattt	480
ttccaatttct gtgttacattt gggtatcttgc attatgttctt acatttgcata cgggtttgcatt	540
ttcattaaacg gtgttggctc ttccagaattt gcttgggggtt tacaaattgtt cccaggtttg	600
gttttatttgc tcgggtttt ctttatccaa gaatctccaa gatggtagc caaacatggat	660
tactggatg aagcagaattt catcggtgcc caaattcaag ctaagggtaa tagagaagac	720
ccagacgtgt tgattgaaat ctccgaaatc aaggaccaaa ttttgcatttga agaaaacctc	780
aagagtttcg gttacgtcga cttatttacc aagaagtata tcagaagaac tttaactgcc	840
atatttgcac aaatctggca acaatttgcacc ggtatgaatg ttatgtatgtt cttatattgtc	900
tacattttca acatggccgg ttactctaacc aacgcaaaact tgggtgcctc ttccatccaa	960
tacgtcttgc acactgtgc aactgttcca gctttttttt taatggatta cattggcaga	1020
agaagattgt tgattggagg tgccatcatg atgatgattt tccaaatttgg tgggtgttgc	1080
atcttaggtt aataactccgt cccccgttcca ggcggtcttc caggttacccc aactgttacc	1140
atccaaatcc cagaagacaa caagtcagct gctagaggtt ttattgttttgc ttgttactt	1200
ttcggttgcattt cattcgcttgc gagttgggggtt gtcggatctt ggggttacttgc ttcaagtt	1260
tgggttgcactt ctgcttccag acagagaggtt gctgctgtttt cttatgtgc caactggatt	1320
cttaacttttgc ctattgcccattt gtacacttcca tcttcatttca agaatatcac ctggaaagact	1380
tacatcatctt acggccgttctt ctgtcttgcattt atggcaatcc atgtctactt tggatttccca	1440
gaaaccaagg gcaagcgtttt ggaagaagtc ggacaaatgtt gggacgaaaaa tgggtttccgc	1500
tggagatctt ccagctggca accaactgtt ccattgttgc cagatgccga cttggcacac	1560
aagatggatg tttccaccaa ggaagagcaat tctccagatgc cccggatcaag ttctgaggaa	1620
aaggcttaa	1629

ES 2 399 297 T3

<210> 3
<211> 1629
<212> ADN
<213> *Pichia stipitis*

5 <400> 3

ES 2 399 297 T3

atgtcttacg aagacaagtt gggtcaaccca gctttgaagt tcagaaccctt cttggacaga	60
ttgcggaaaca tttacaacgt ttacatttattt gcttcttattt cttgtatttc tggttatgtat	120
ttcggtttcg acatttcttc tatgtctgct ttcattgggt aagacgacta caagaacttc	180
ttcaacaacc cagggtctga cattcaaggt ttcattaccc tttgtatggc tttgggttct	240
ttcttcgggtt ctattgttcc ttctttcatt tctgaaccat tcggtagaaag agcttcttgc	300
ttgttgtgtt ctttcttctg gatgggtgg gctgctgttc aatcttcttc tcaaaaacaga	360
gctcaattga tgattggtag aattattgtt ggtttcggtt ttgggttcgg ttcttctgtt	420
gctccagttt acgggtctga attggctcca agaaagatta gaggtttcgt tggtggattt	480
ttccaattct gtgttacctt gggatatttg attatgttctt acatttgcata cggtttgcac	540
ttcattaacg gtgttgggtt tttcagaatt gcttgggggt tgcaaattgt tccaggttt	600
gttttgggtt ttgggtgtt ttcatcaca gaatctccaa gatgggtggc taagcacgg	660
tactgggacg aagctgaattt cattgttgctt caaattcaag ctaaggtaa cagagaagac	720
ccagacgttt tgattgaaat ttctgaaattt aaggacccaa ttgttattgtt agaaaaacttg	780
aagtcttcg gttacgttga cttgttccacc aagaagtaca tttagaagaac cttgaccgct	840
attttcgctc aaatttggca acaatttggacc ggtatgttgc ttatgtatgtt ctacattgtt	900
tacattttca acatggctgg ttactctaacc aacgctaact tggttgcctt ttctattcaa	960
tacgttttga acaccgctgc taccgttcca gctttgttct tgatggacta cattggtaga	1020
agaagattgt tgattgggtt tgcttattatg atgtatgtt tccaaattcgg tggtgttgc	1080
attttgggtt agtactctgt tccagttcca ggtgggttgc caggttaccc aaccgttacc	1140
attcaaaatttcc cagaagacaa caagtctgctt gcttagaggtt ttattgttgc ttgttacttg	1200
ttcggttgc ttcatcgctt gtcttgggtt gttggattt gggtttactg ttctgaagtt	1260
tgggtgtact ctgttcttag acaaagaggtt gctgctgtt ctaccgctgc taactggatt	1320
ttgaacttcg ctattgttatgtt gtacacccca tcttcttca agaacattac ctggaaagacc	1380
tacatttattt acgttgcattt ctgtttgggtt atggcttattt acgttactt cgggtttccca	1440
gaaaccaagg gtaagagattt ggaagaagttt ggtcaaatgtt gggacgaaaaa cgttccagct	1500
tggagatctt cttcttggca accaaccgtt ccattgttgc ttgtgttgc cttggctcac	1560
aagatggacg ttcttcacaa ggaagaacaa tctccagacg ctgaatcttc ttctgaagaa	1620
aagccataa	1629

<210> 4
<211> 2430

ES 2 399 297 T3

<212> ADN
 <213> *Pichia stipitis*

<400> 4

acaatttgt ggaataatcc cccaccttga taatccttct taggaacaat aaccggcgag	60
atgtgcgggg cacgtcagga aacttaacct tgcgcctta aattgccgtg aaggagagcc	120
atacgatgga actccaaact tttatagtac atatagagtg gagtttgtt ggggaagtgg	180
gaccatgggt caggaatttt gccgaaaaag ggcgggtttt ttcactccta gtgcataatg	240
cctgtgtata gacgatcaac ttgtatataat gtctgcatac cccaaatatt cacaattgac	300
ccgcatcaaa aaataattct atctgacatc acgtatgcaa atacagttag gaaatccatt	360
cttgctgcca actcttcgccc ttttactca tccttgaaga aggaatctt gcaatataaa	420
agtaagatga aattcctctt attttacaat gttttgtcaa gtcttaaga aatttactct	480
atcgtattta atattatate atgagctacg aagataaaact cgttcaacct gccttgaagt	540
tcaggacctt cttggacaga cttccaaaca tttacaatgt gtacattatt gcatctattt	600
cctgtatttc aggtatgatg ttccgggtttt atatttcattc tatgtctgt tttataggtg	660
aagatgacta caagaacttt ttcaataatc caggctcaga catccaaggt tttatcactt	720
cctgtatggc tttaggttct ttcttcgggt ccatagtctc ttcccttatt tccgaaccat	780
ttggtagaaag agcatccttg ttgttgtt cattcttctg gatggtcggg gctgctgtac	840

ES 2 399 297 T3

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido, seleccionado del grupo de

- a. un polipéptido, que es hasta al menos el 80 % idéntico a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 y que presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*, y
- 5 b. un polipéptido, que es idéntico a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO:1 y que presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*,

siendo la pentosa preferentemente arabinosa, en particular L-arabinosa.

2. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un fragmento de al menos 200 o 300 aminoácidos continuos según la SEQ ID NO: 1, que presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*, comprendiendo preferentemente un fragmento de 502 aminoácidos, que corresponde a los primeros 502 aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 y que presenta una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*, y/o

10 siendo el polipéptido hasta al menos el 90 %, preferentemente el 95 % idéntico a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 y presentando una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*, y/o
15 que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas,
que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas,
siendo la pentosa preferentemente arabinosa, en particular L-arabinosa.

3. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, procediendo el polipéptido de una levadura, preferentemente de *Pichia*, en particular *Pichia stipitis*.

20 4. Molécula de ácido nucleico aislada, que codifica para un polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3,
en la que el ácido nucleico es preferentemente hasta al menos el 90 %, preferentemente el 95 % y más preferentemente el 99 % idéntico a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO:2 o 3,
25 comprendiendo la molécula de ácido nucleico preferentemente ADNbc, ADNm, PNA, CNA, ARN o ARNm o combinaciones de los mismos.

5. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además secuencias de ácido nucleico de vector, preferentemente secuencias de vector de expresión,
preferentemente que comprende además secuencias de ácido nucleico, que codifican para polipéptidos heterólogos adicionales,
30 comprendiendo la molécula de ácido nucleico preferentemente ADNbc, ADNm, PNA, CNA, ARN o ARNm o combinaciones de los mismos.

6. Célula huésped, que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 y que preferentemente expresa la misma, que es preferentemente una célula de hongo y más preferentemente una célula de levadura, tal como *Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., *Hansenula* sp., *Pichia* sp. o *Yarrowia* sp.

35 7. Célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, que contiene además moléculas de ácido nucleico, que codifican para proteínas de la ruta metabólica de la arabinosa,
codificando las moléculas de ácido nucleico preferentemente para proteínas de la ruta metabólica de la arabinosa bacteriana.

40 8. Célula huésped de la cepa MKY06-4P, que se depositó el 23 de agosto de 2006 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares con el número de depósito DSM 18544.

9. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que comprende una parte inmunológicamente activa, que se une de manera selectiva a un polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.

45 10. Procedimiento para la producción de un polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8 en condiciones en las que la se expresa molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 o 5.

11. Procedimiento para la identificación de un compuesto que se une a un polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 y/o que modula su actividad, que comprende las etapas de:

50 poner en contacto un polipéptido o una célula, que expresa un polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, con un compuesto de prueba, y
determinar si el polipéptido se une al compuesto de prueba y, opcionalmente, determinar si el compuesto de prueba modula la actividad del polipéptido,
siendo el compuesto preferentemente una pentosa, tal como por ejemplo arabinosa, y en particular L-arabinosa,
o un derivado de una pentosa de este tipo.

12. Procedimiento para la modulación de la actividad de un polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1

a 3, que comprende poner en contacto un polipéptido o una célula, que expresa un polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, con un compuesto, que se une al polipéptido en una concentración suficiente para modular la actividad del polipéptido, siendo el compuesto preferentemente una pentosa, tal como por ejemplo arabinosa, y en particular L-arabinosa, o un derivado de una pentosa de este tipo.

- 5 13. Procedimiento para la producción de bioetanol, que comprende la expresión de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 o 5, en una célula huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8.
- 10 14. Uso de un polipéptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 o 5 o de una célula huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8 para la producción de bioetanol y/ o para la fermentación recombinante de biomaterial que contiene pentosa.

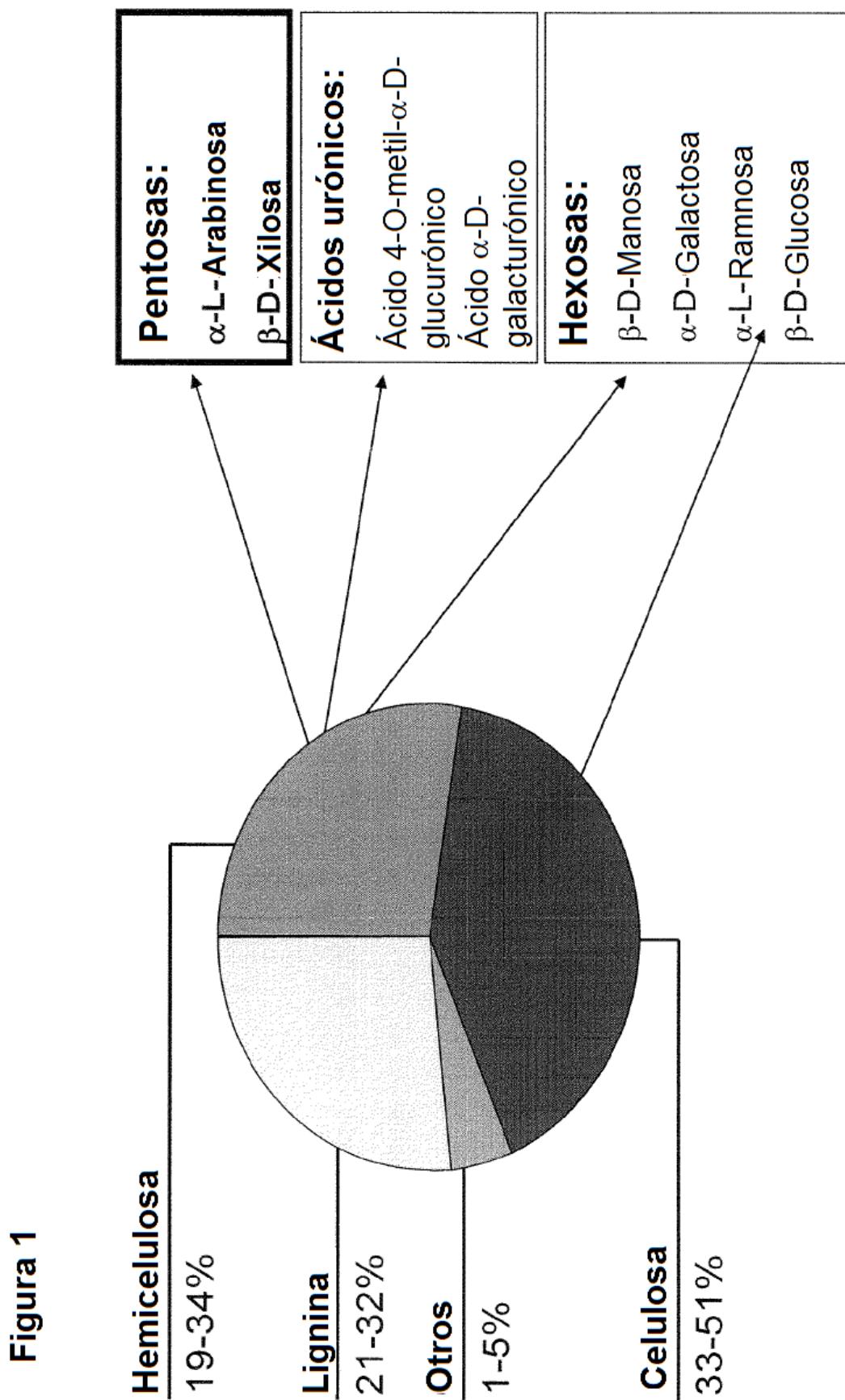


Figura 2

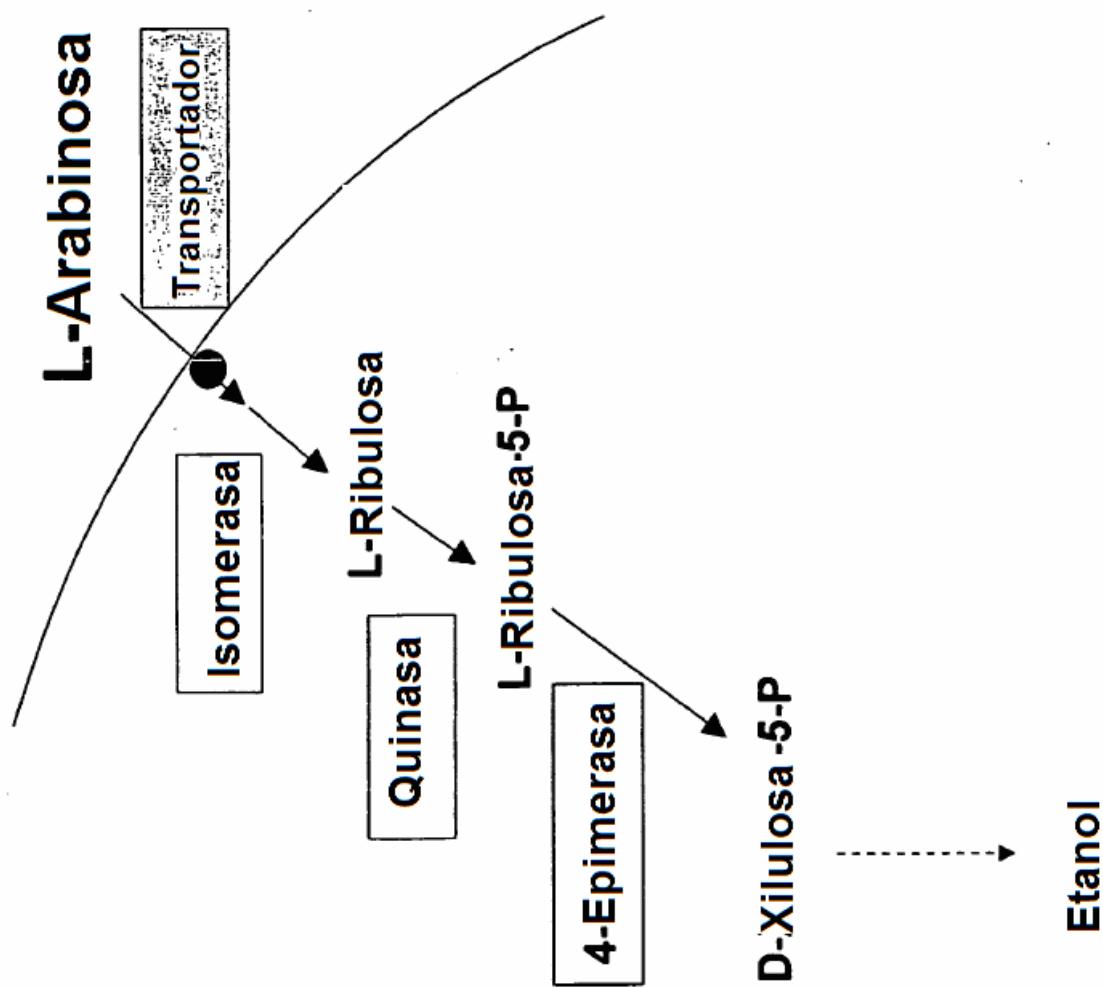
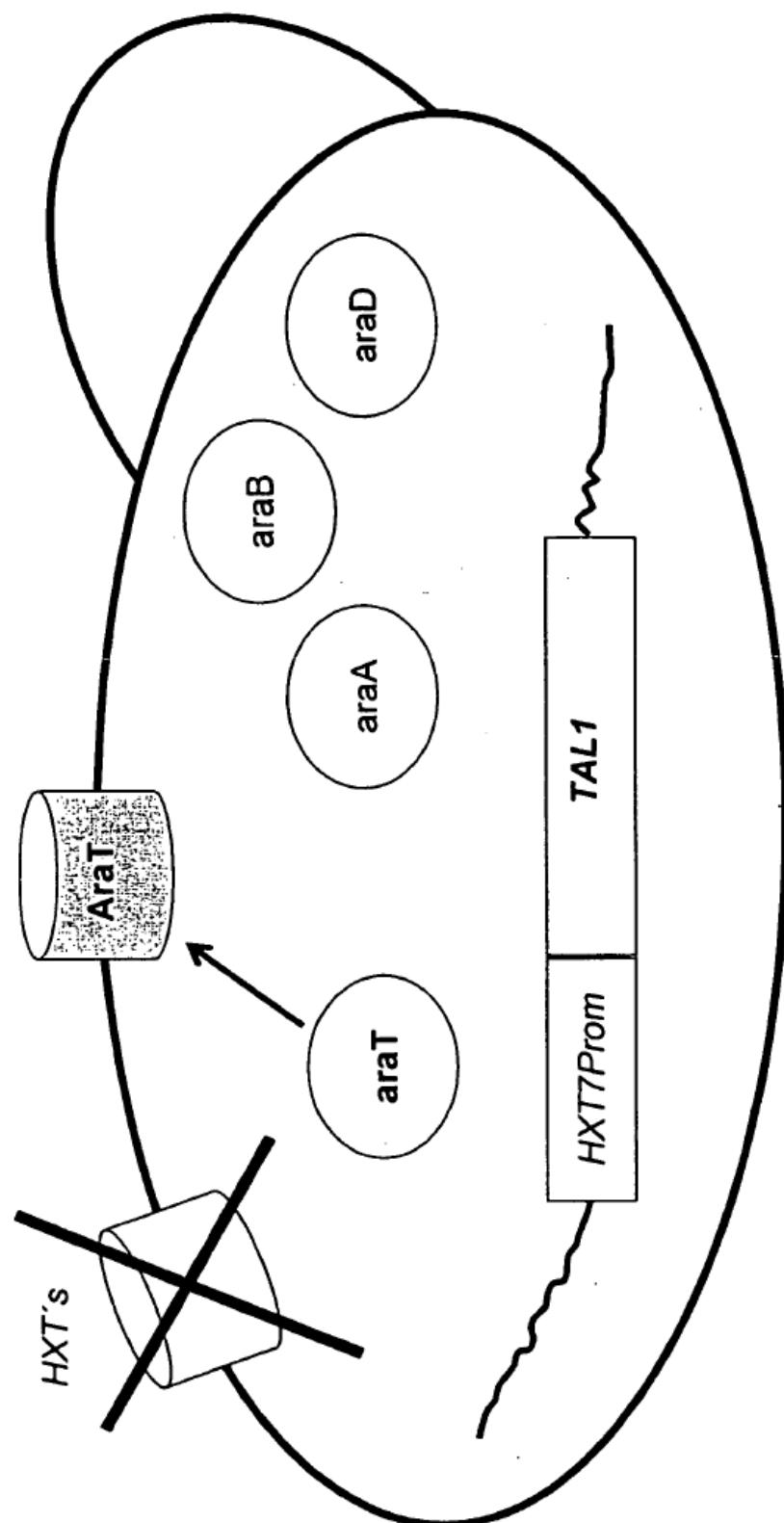


Figura 3



MIKY06-4P

Figura 4A
2 % de Arabinosa

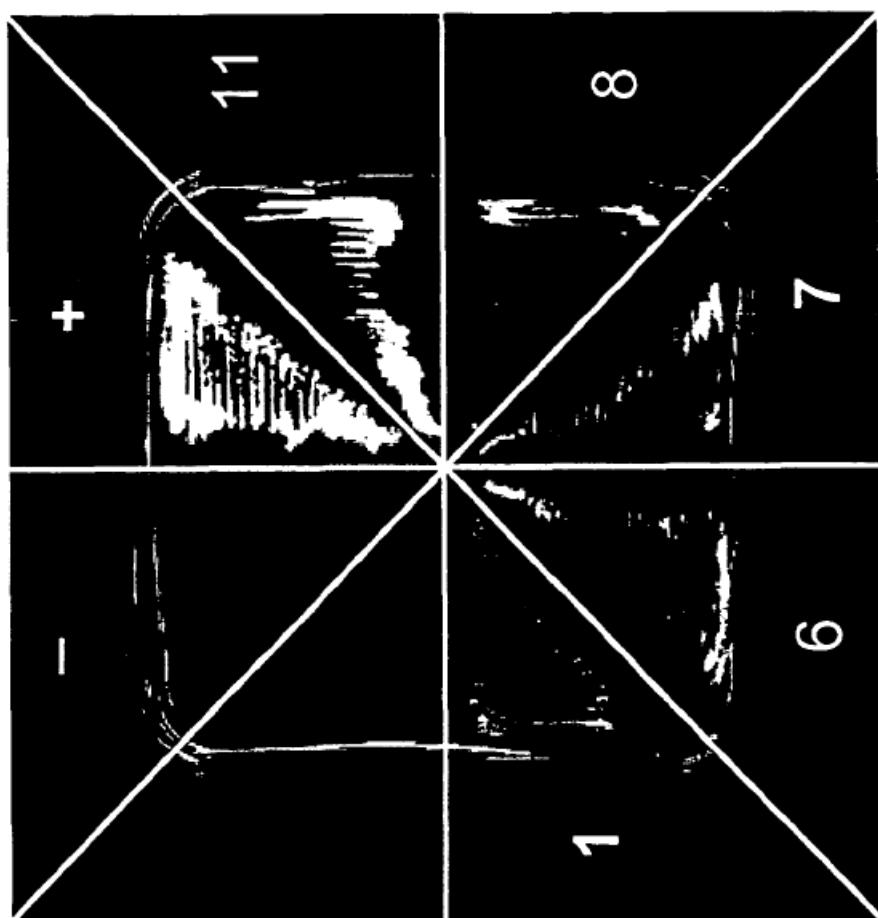
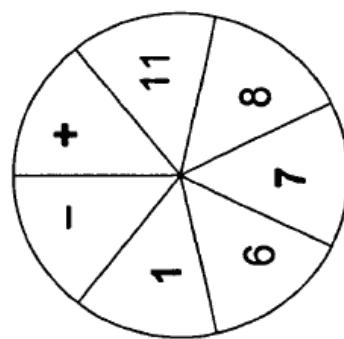
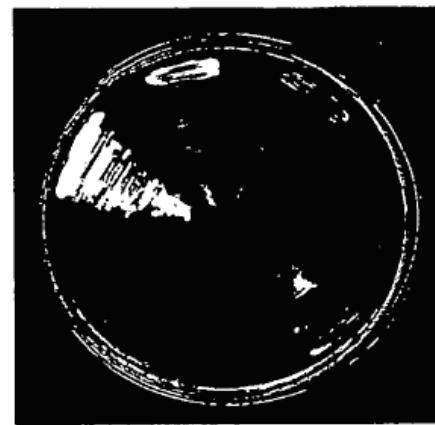


Figura 4B

2 % de Galactosa



2 % de Glucosa



2 % de Manosa



Figura 5

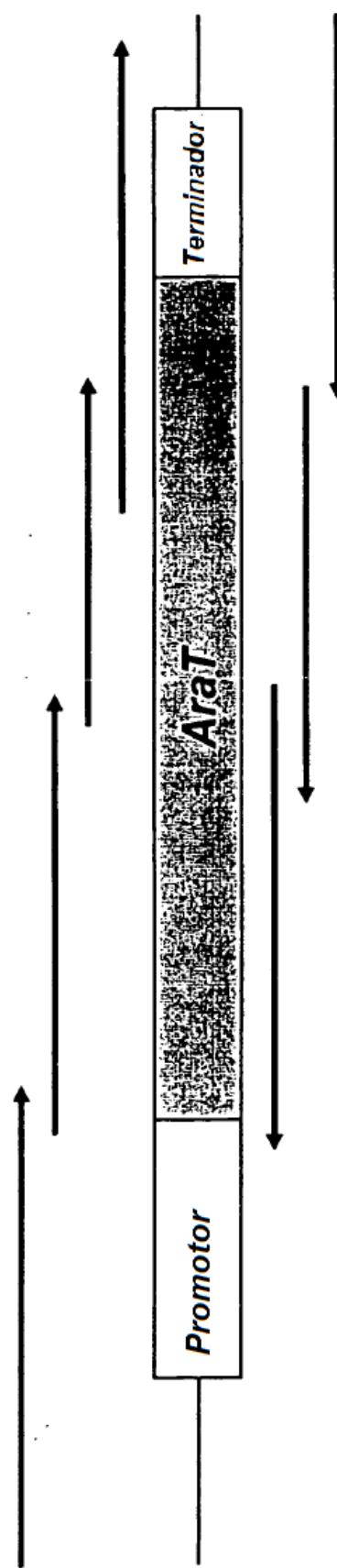


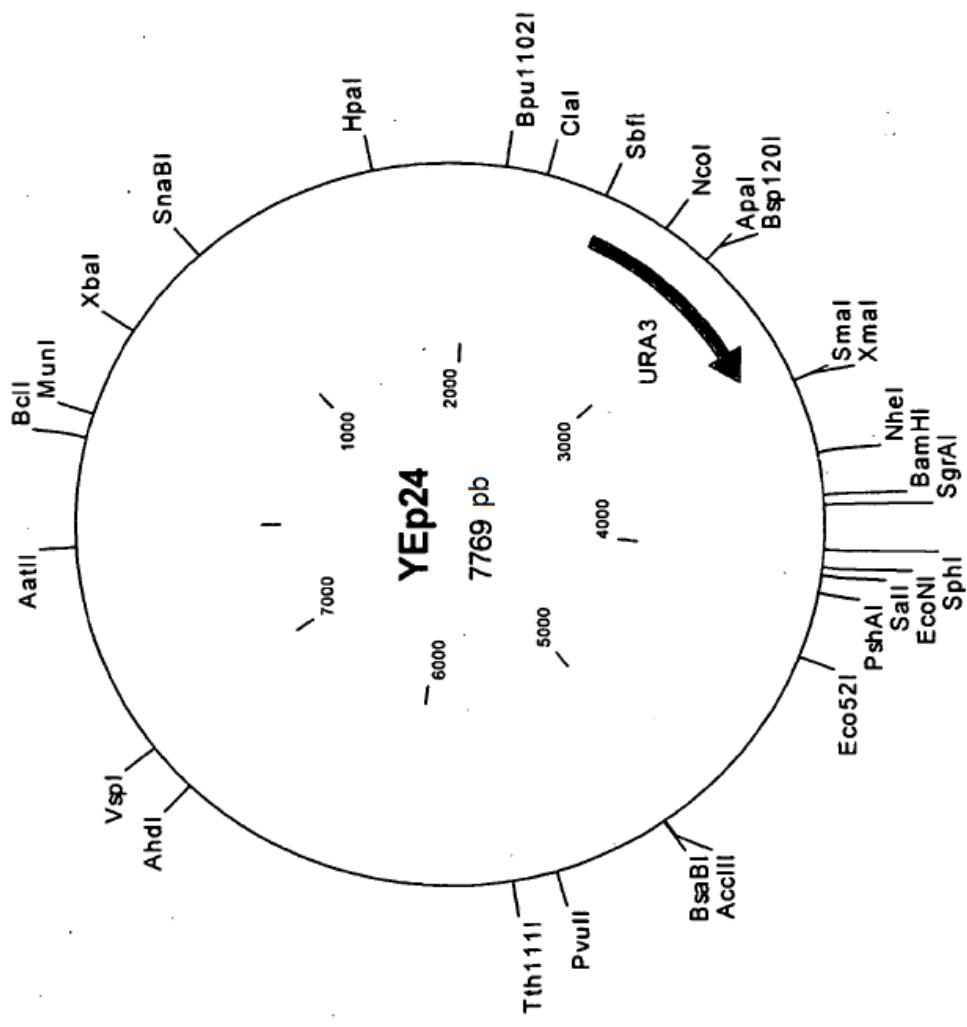
Figura 6A

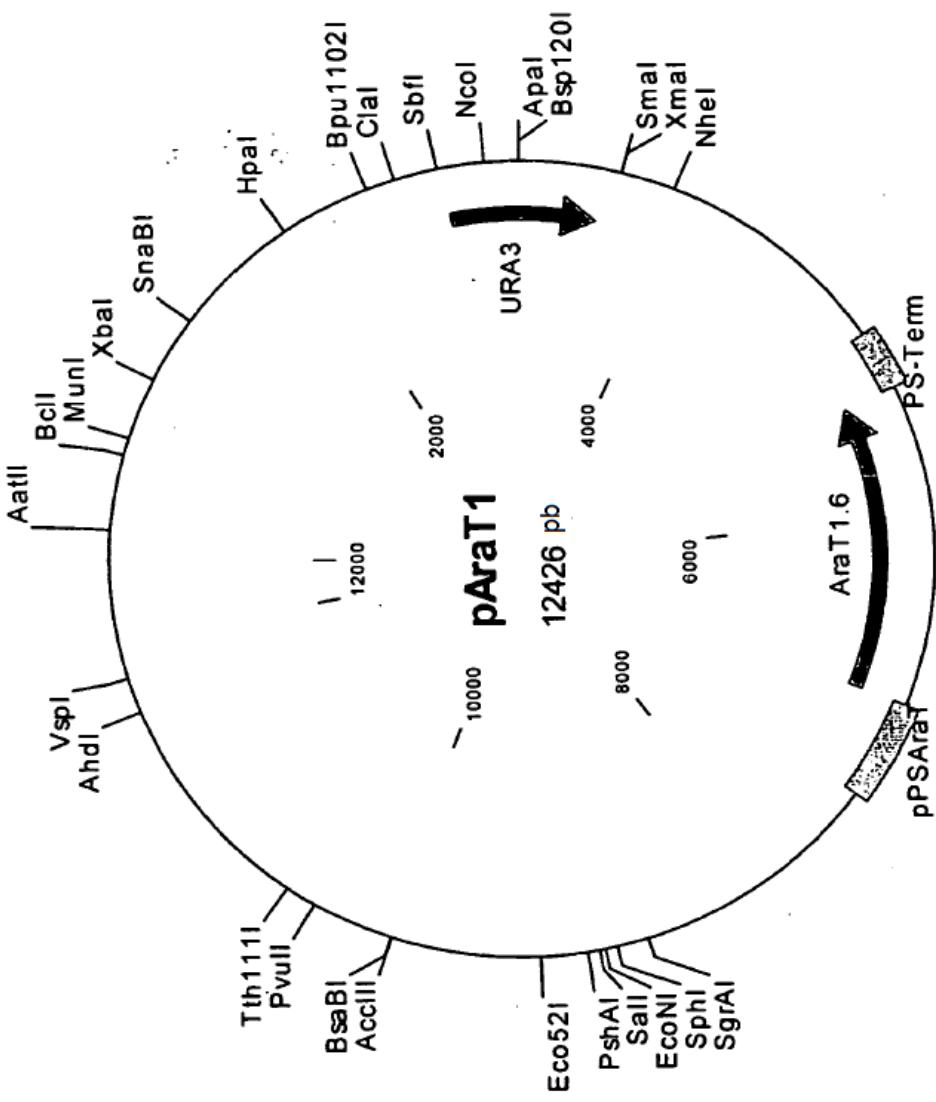
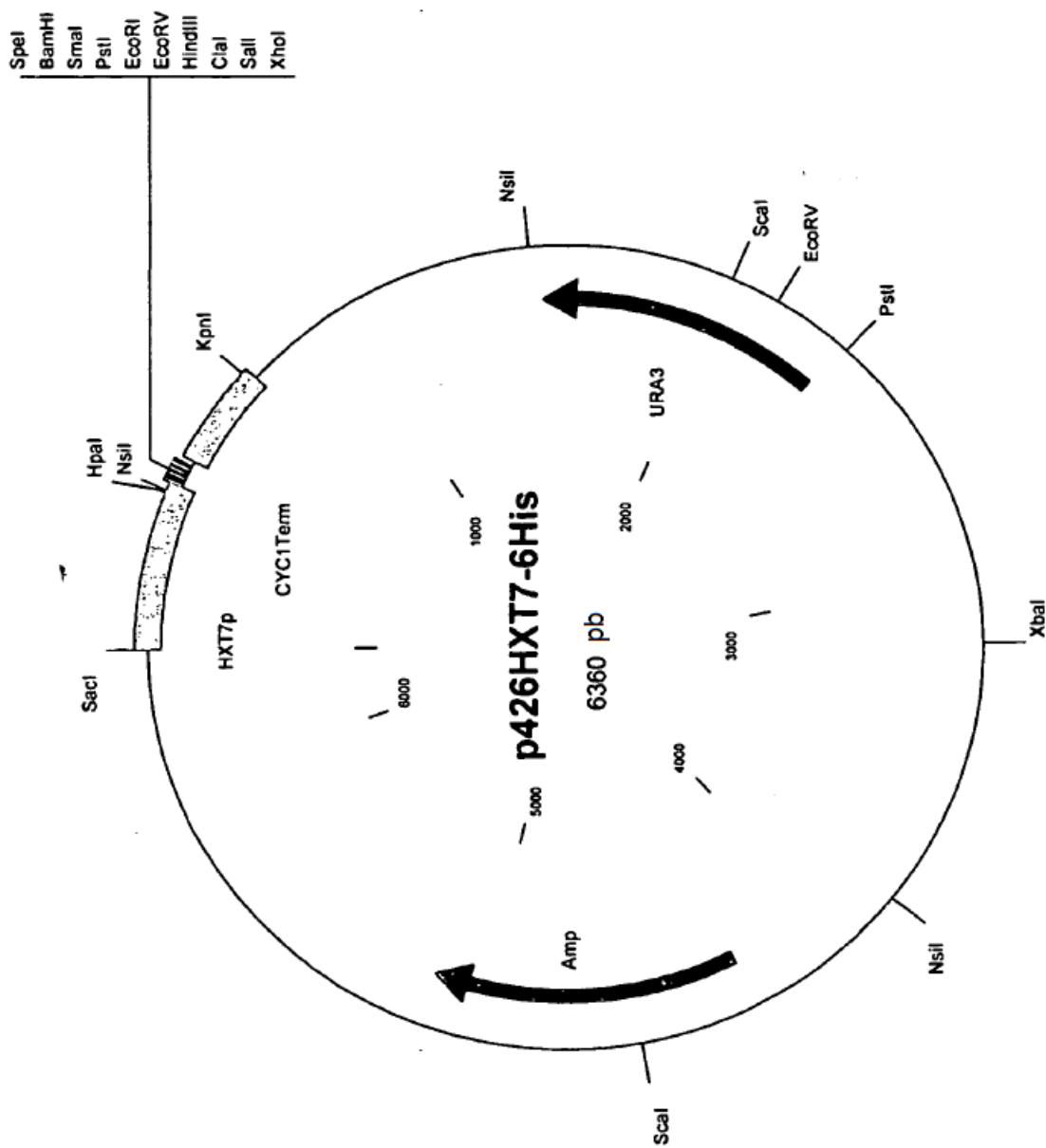
Figura 6B

Figura 6C

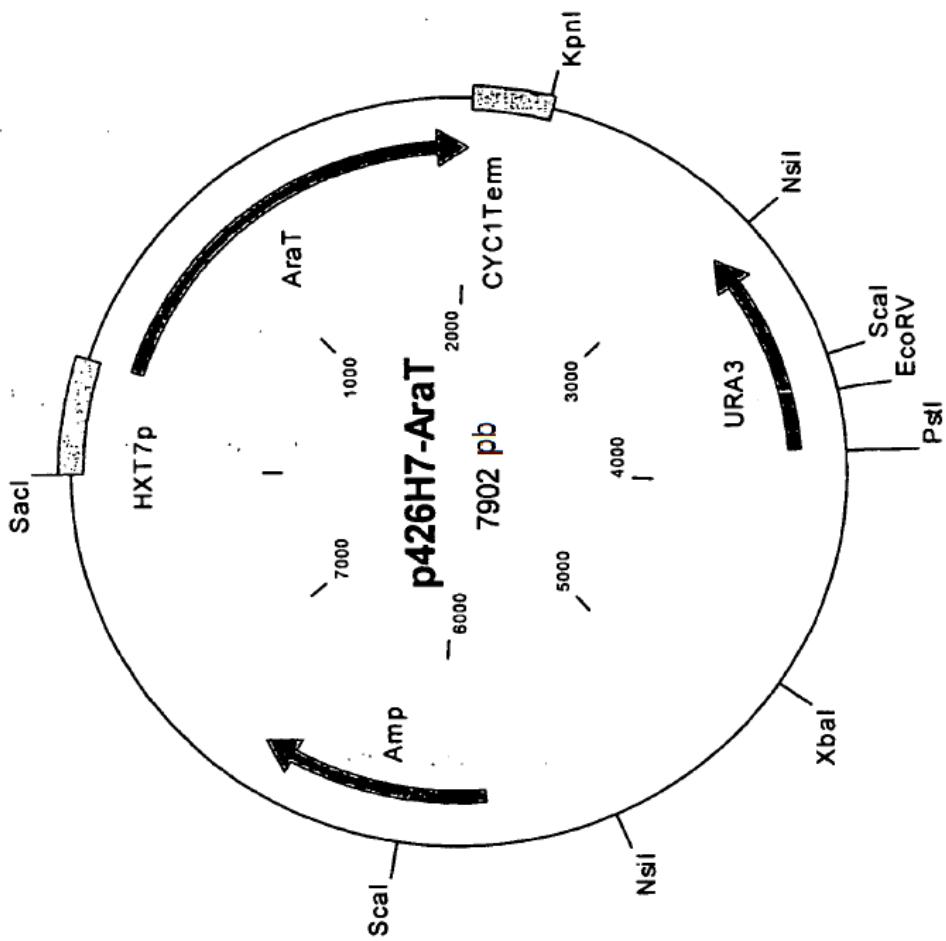


Figura 6D

Figura 6E

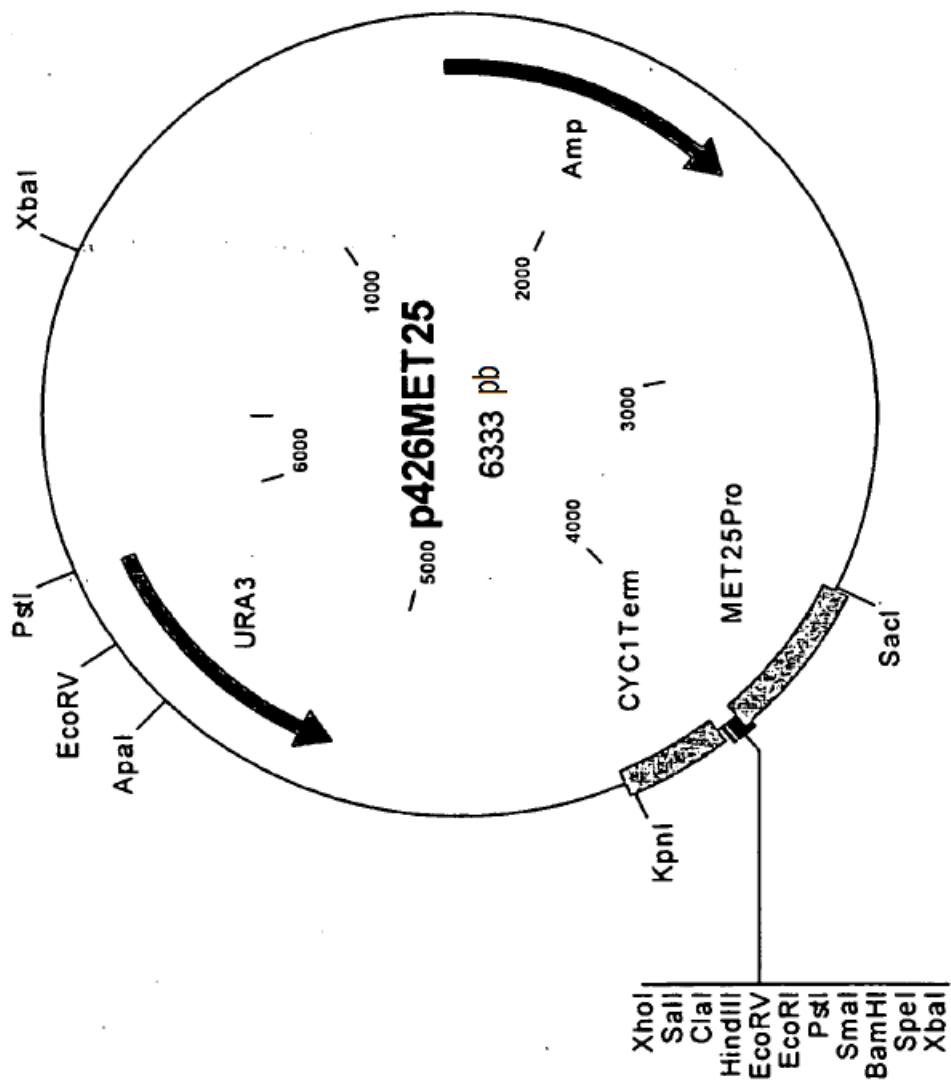
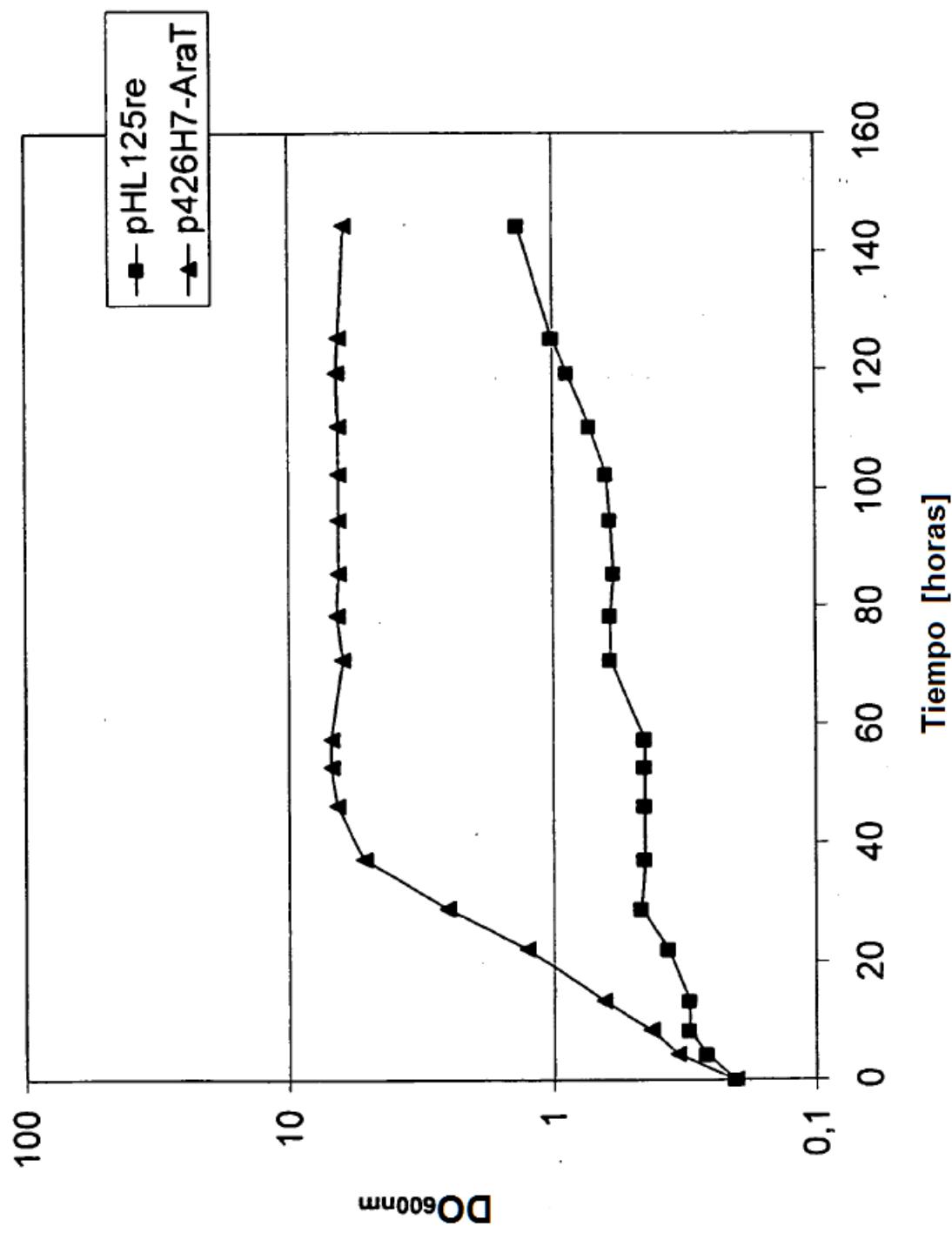


Figura 7A



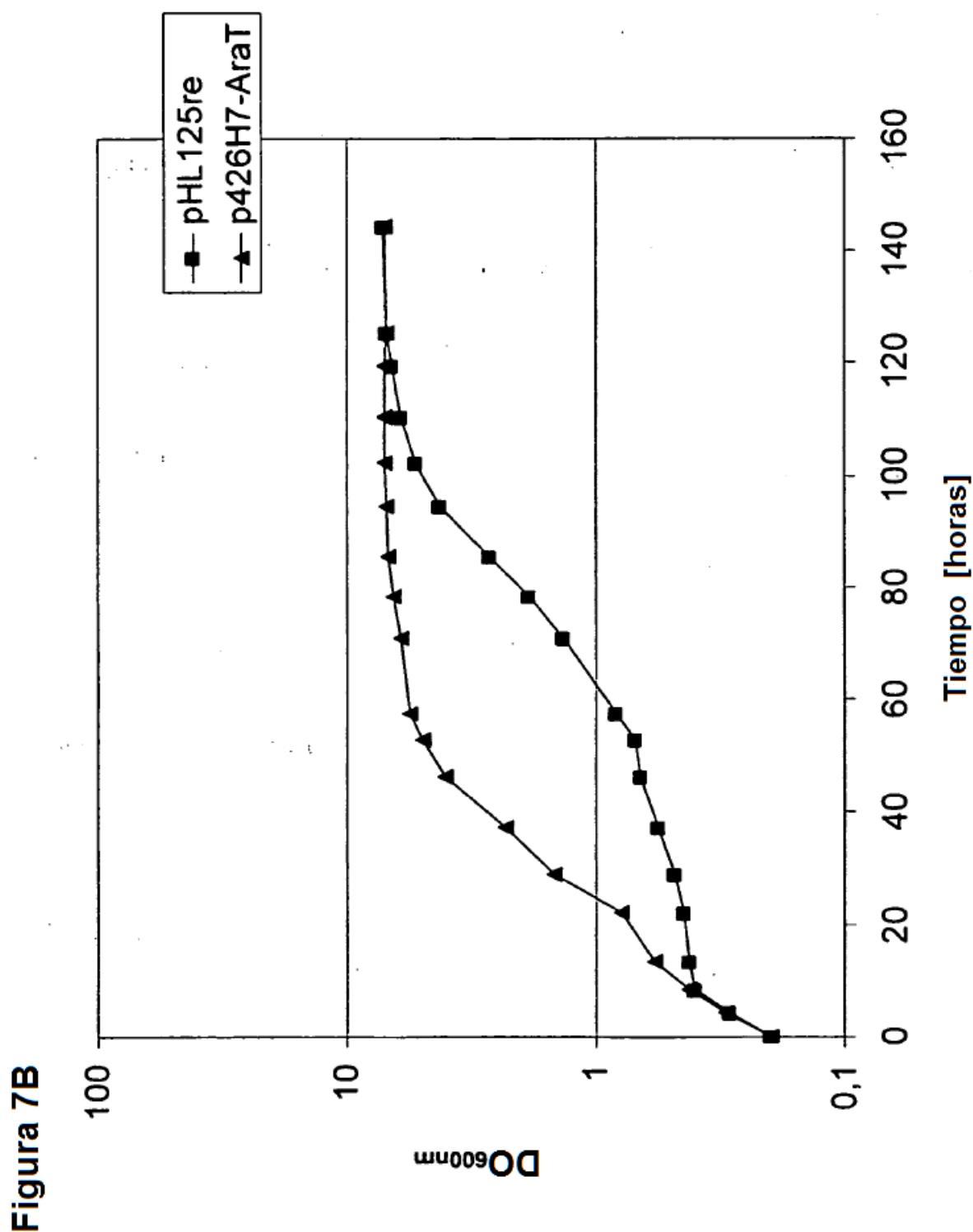


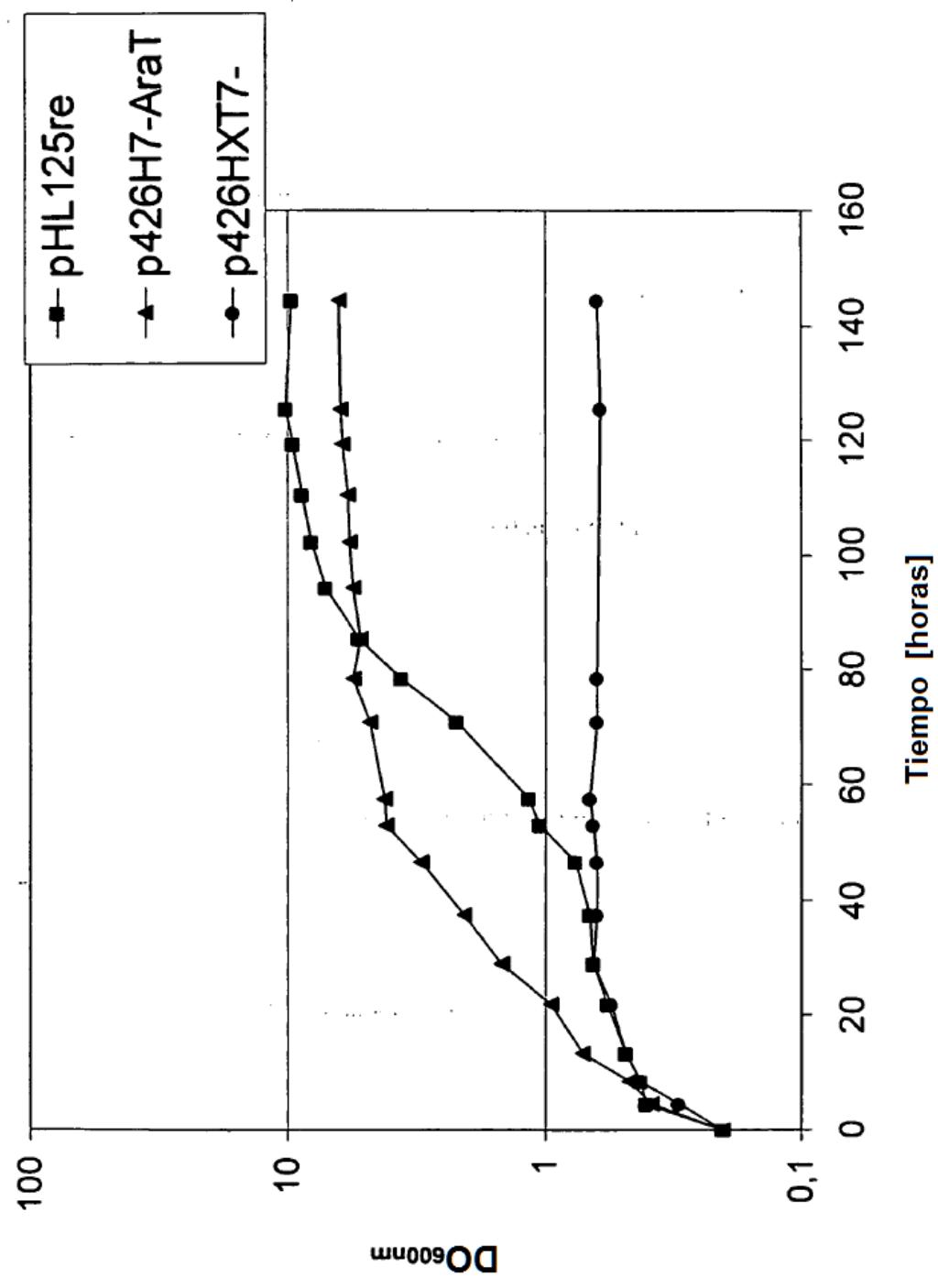
Figura 7C

Figura 8