(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 426 966**

(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) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2004** **E 10183744 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2338895**

(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 y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2013

(73) Titular/es:

CARGILL, INCORPORATED (100.0%)
15407 McGinty Road West
Wayzata, MN 55391, US

(72) Inventor/es:

RAJGARHIA, VINEET;
KOIVURANTA, KARI;
PENTILLÄ, MERJA;
ILMEN, MARJA;
SUOMINEN, PIRKKO;
ARISTIDOU, ARISTOS;
MILLER, CHRIS;
OLSON, STACEY y
RUOHONEN, LAURA

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 966 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

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 reinvindica 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 géneticamente modificadas.

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 tipica 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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* sp. 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.

En un aspecto, esta invención es una célula de levadura genéticamente modificada que tiene una deleción o alteración de un gen nativo que produce una enzima que cataliza la conversión de xilosa a xilitol, y una deleción o alteración de un gen de xilitol deshidrogenasa nativo.

En un segundo aspecto, esta invención es un proceso de fermentación en el que una célula, tal como se definió anteriormente, se cultiva bajo condiciones de fermentación en un caldo de fermentación que incluye un azúcar de pentosa, y en el que se produce etanol como principal producto de la fermentación.

En otro aspecto, esta invención es un proceso de fermentación en el que una célula, tal como se definió anteriormente, se cultiva bajo condiciones de fermentación en un caldo de fermentación que incluye un azúcar de pentosa, en el que el azúcar de pentosa incluye xilosa.

En otro aspecto, esta invención es un proceso de fermentación en el que una célula de levadura genéticamente modificada, que tiene un genoma y un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional unido operativamente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, que además contiene un gen de xiluloquinasa exógeno funcional unido operativamente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, y que además tiene una deleción o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa nativo, se cultiva bajo condiciones de fermentación en un caldo de fermentación que incluye un azúcar de pentosa, en el que el azúcar de pentosa incluye xilosa.

La figura 1 es un diagrama que muestra el plásmido pNC2.

La figura 2 es un diagrama que muestra el plásmido pNC4.

La figura 3 es un diagrama que muestra el plásmido pVR22.

La figura 4 es un diagrama que muestra el plásmido pVR29.

Las figuras 5a y 5b son diagramas que muestran los plásmidos pBH5a y pBH5b.

Las figuras 6a, 6b y 6c son diagramas que muestran el ensamblaje del plásmido pVR78 a partir de los plásmidos pVR73 y pVR77.

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.

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.

Las figuras 15a y 15b son diagramas que muestran 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.

Las figuras 19a y 19b son diagramas que muestran los plásmidos pVR65 y pVR104.

Las figuras 20a y 20b son diagramas que muestran 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.

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.

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.

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.

La levadura genéticamente modificada de la invención se fabrica realizando ciertas modificaciones genéticas en una células 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-oxidorreductasa. La enzima codificada por estos genes en general tiene la siguiente actividad: D-xilosa + NAD(P)H = xilitol + NAD+ (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”.

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 tendra 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+ 2-oxidorreductasa (formadora de D-xilulosa). Estos genes en general tienen la siguiente actividad: xilitol + NAD(P)+ = D-xilulosa + NAD(P)H (aunque NAD+ es el 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.

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.

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. balnkii, C. entomophila, C. scehatae, P. tannophilus* y *P. stipitis*. Son ejemplos de células de levadura que crecen sobre la xilosa *K. marxianus, C. sonorensis, C. scehatae, 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*.

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 deleción 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 deleción de otro gen nativo tal como, por ejemplo, un gen XR, XDH o PDC.

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.

El gen XI exógeno puede integrarse aleatoriamente en el genoma de la célula hospedante o insertarse en una o más ubicacaciones 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 deleción 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.

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.

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 deleción 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.

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 deleciona. En general, el gen o genes seleccionados para la alteración o deleción 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 delecionar o alterar al menos un gen XR. La deleción 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.

“Delecionar o alterar” significa que la región codificadora completa del gen se elimina (deleción), o el gen o su región promotora y/o terminadora se modifica (tal como mediante deleción, inserción o mutación) de modo que el gen ya no produce una enzima activa o produce una enzima con una actividad muy reducida. La deleción 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 delecionar 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 delecionar el gen diana en una recombinación homóloga, insertando el gen marcador de la selección en el locus del gen diana delecionado. 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 deleciona de modo adecuado. La deleción o alteración del gen XDH puede realizarse de una manera análoga a la descrita anteriormente con respecto a la deleción o alteración de la aldosa reductasa. La deleción 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 deleción 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-xilulosa = ADP + D-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 ubicacaciones 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.

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*.

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*.

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*.

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*.

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*.

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*.

7. El módulo *HisG-Ura3-HisG* precedido o seguido de un módulo de XI o un módulo de XK.

8. Un modulo 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 modulo 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.

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, PGC 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*.

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.

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*.

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*.

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) sumistran 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.

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 delecionado puede confirmarse utilizando métodos de ensayo conocidos.

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.

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.

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 amoniaco o sales de amonio, y similares), y diversas vitaminas, minerales y similares.

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 ºC, 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 ºC. Cuando la célula es una *K. marxianus* modificada puede tolerar unas temperaturas relativamente altas (tales como mayores que 40 ºC y hasta 50 ºC, en especial hasta 45 ºC). Otra especie preferida de célula, *C. sonorensis*, puede tolerar temperaturas de hasta aproximadamente 40 ºC. 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 ºC o más, en especial 45 ºC o más, sin dañar significativamente las células deseadas de la invención.

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.

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.

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, en los que los ejemplos 13E, 13H, 13I y 14C no se refieren a la invención reivindicada. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención. 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.

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.

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 ºC, 1 minuto a 56 ºC, y 1 minuto a 72 ºC, seguido de una incubación final de 7 minutos a 72 ºC, utilizando la ADN polimerasa PfuTurbo (Stratagene, Madison, WI). La secuencia de nucleótidos del promotor *ScPDC1* se identifica como SEC ID NO:5.

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 *Xba*I, *Eco*RI y *Bam*HI para insertar genes concretos para ser expresados entre el promotor y el terminador de levadura. Un fragmento de restricción *Not*I 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.

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 *Not*I 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 ºC, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 ºC, 30 segundos a 49 ºC, y 2 minutos a 72 ºC, seguido de una incubación final durante 10 minutos a 72 ºC. 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 ºC, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 ºC, 30 segundos a 49 ºC, y 2 minutos a 72 ºC, seguido de una incubación final durante 10 minutos a 72 ºC. 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 ºC, después con 35 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 30 segundos a 55 ºC, y 1,5 minutos a 72 ºC, seguido de una incubación final de 7 minutos a 72 ºC. 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 ºC, después con 35 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 30 segundos a 55 ºC, y 45 segundos a 72 ºC, seguido de una incubación final de 4 minutos a 72 ºC. 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 ºC, 1 minuto a 55 ºC, y 1 minuto a 68 ºC, seguido de una incubación final a 68 ºC 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 ºC 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 *Sph*I, 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 *Sbf*I y *Bsm*BI 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 *Sbf*I 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 *Sbf*I 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 *Sbf*I 5' inmediatamente cadena arriba del marcador de poli-his y 3' del sitio *Sap*I. La reacción de PCR se realizó utilizando métodos convencionales. Las condiciones de PCR consistieron en una incubación inicial a 94 ºC durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 30 segundos a 63 ºC, y 1 minuto a 68 ºC. A esto le siguieron 20 ciclos más de 30 segundo a 94 ºC, 1 minuto a 68 ºC. La etapa final fue una incubación de 8 minutos a 68 ºC. La amplificación se realizó utilizando la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen, CA). El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción *Sbf*I y *Sap*I. Un fragmento de aproximadamente 3,9 kb obtenido mediante la digestión del plásmido pVR78 con las enzimas 5'*Sbf*I y 3'*Sap*I se acopló con el producto de la PCR. Este plásmido resultante se denominó pCM3 (figura 7).

Ejemplo 1H: Construción 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 ºC, 1 minuto a 56 ºC, y 3 minutos a 72 ºC, seguido de una incubación final de 7 minutos a 72 ºC utilizando la ADN polimerasa PfuTurbo (Stratagene, Madison, WI). El producto de la PCR se separó electoforéticamente 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 *Xba*I y *Bam*HI y se acopló en el fragmento *Xba*I-*Bam*HI 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 *Sph*I, 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 *Sph*I. El plásmido resultante (pCM9, figura 9) contiene la región promotora *KmPDC1*, seguida de un unico sitio *Sbf*I 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 $MgSO_4$ 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 ºC durante 1 minuto, 54 ºC durante 1 minuto, y 68 ºC durante 2 minutos (añadiéndose 5 segundos más a cada ciclo sucesivo), seguido de una conservación a 4 ºC.

En las etapas de reacción 2-17, se utilizó la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen, CA), y su tampón y $MgSO_4$ 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 reación anterior. El ciclado en las etapas 2-17 fue de 20 ciclos a 94 ºC durante 1 minuto, 46 ºC durante 1 minuto, y 68 ºC durante 2 minutos (añadiéndose 5 segundos más a cada ciclo sucesivo), seguido de una conservación a 4 ºC.

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

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) acoplando 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 diferencia 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 *Dpn*I a la mezcla al final del termociclado. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 ºC 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 ºC durante la noche. Entonces se repitió el protocolo de mutagénesis dirigida a múltiples sitios para remediar el quinto error. Se 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.

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*

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 ºC, 30 segundos a 55 ºC, 1,5 minutos a 72 ºC, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 72 ºC utilizando la ADN polimerasa *Pfx* (Invitrogen, CA). El producto de la PCR se digirió con *Sbf*I y se separó

electoforéticamente 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 *Sbf*I, 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 *Sbf*I, siguiendo el mismo protocolo que se describe en el ejemplo 2B, para crear un plásmido de aproximadamente 8148 pb (pCM14, figura 11).

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 deleción del módulo de expresión de hgh

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 auxotrofía para el uracilo de la cepa de levadura para la posterior transformación con el mismo módulo.

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 *Bam*HI y *Eco*RI y acoplando un fragmento de aproximadamente 3,8 kpb al plásmido digerido con *Bam*HI y *Eco*RI pPUC19 (New England Biolabs, EEUU). El plásmido resultante se denominó pVR65 (figura 19).

El plásmido pCM14 (ejemplo 3A, figura 11) se digirió con *Aat*II/*Sph*I 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 *Aat*II/*Sph*I 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

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 region 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 ºC, 1 minuto a 56 ºC, 3 minutos a 72 ºC, seguido de una incubación final de 7 minutos a 72 ºC 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 ºC, 1 minuto a 53 ºC, 1 minuto a 68 ºC, y una incubación final de 8 minutos a 68 ºC utilizando la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, CA). El producto de la PCR se separó electroforéticamente, se digirió con *Pst*I y se acopló a pVR29 (ejemplo 1C, figura 4) que también se había digerido con *Pst*I. 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 ºC, 1 minuto a 59 ºC, 1 minuto a 68 ºC, y una incubación final de 8 minutos a 68 ºC 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 ºC, 1 minuto a 45 ºC, 1 minuto a 68 ºC, y una incubación final de 8 minutos a 68 ºC utilizando la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, CA). El producto de la PCR obtenido después del segundo termociclado se separó electroforéticamente, se digirió con *Apa*I y se acopló al plásmido pCM18 que también se había digerido con *Apa*I, 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 (nº 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 *Eco*RV y se aisló un fragmento de aproximadamente 4 kpb que tiene el gen *KmUra3* sin un fragmento *Eco*RV, y se reacopló para formar el plásmido pBSDeltaUra3Km (figura 15). Este plásmido tiene un gen no funcional (*DeltaUra3*). El plásmido se digirió utilizando *Kpn*I y *Not*I 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 *Pvu*II. 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 ºC 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 delecionado 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 ºC 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), ditiotreitol 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 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). 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 NAPDH 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 ºC, seguido de 35 ciclos que consisten en 15 segundos a 94 ºC, 15 segundos a 55 ºC, y 90 segundos a 68 ºC. 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 *Xba*I y *Sst*I. El producto de la PCR y el plásmido pNC2 (ejemplo 1A, figura 1) se digirieron con las enzimas *Xba*I y *Sst*I y se acoplaron para obtener el plásmido pVR52 (figura 16).

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 *Xba*I y *Bam*HI. 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 *Xba*I y *Bam*HI, 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 ºC, 30 segundos a 57 ºC, y 30 segundos a 72 ºC, seguido de una incubación final de 4 minutos a 72 ºC 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 *Eco*RI y se acopló al plásmido pVR96 digerido con *Eco*RI (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 *Sph*I y se acopló al pPUC19 digerido con *Sph*I (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*.

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 *Sph*I, y los extremos 5'-fosfato del vector linealizado se desfosforilaron utilizando fosfatasa alcalina de camarón (Roche Diagnostics, EEUU) seguiendo el protocolo del fabricante.

El plásmido pVR103 (ejemplo 5C, figura 18) también se digirió con *Sph*I, y un fragmento de 3,5 kpb que tiene el gen 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 delecionado por la cepa transformante CD804 (ejemplo 4D)

Se empleó un fragmento *Pvu*II 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 ºC 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.

Una única colonia positiva de la cepa transformada se inoculó en 50 ml de medio YPD y se incubó durante la noche a 37 ºC con agitación a 200 rpm. Se cultivaron 10 μl sobre placas 5-FOA y se incubaron durante la noche a 37 ºC. 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.

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.

Ensayo de la actividad xilulosaquinasa: 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 ºC, 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 ºC (que contenía 61 mg de $Na_2ATP \cdot 3H_2O$, 10,0 ml de HEPES 0,1 M/KOH (pH 7,5), 1,2 ml de $MgCl_2$ 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 transladándose a hielo. Se añadieron 900 μl de Hek2 (HEPES 40 mM/KOH (pH 7,5), $MgCl_2$ 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 nº 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 ºC, 30 segundos a 52 ºC, 1 min a 68 ºC, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 68 ºC 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 *Eco*RI y se separó en un gel al 1,0%. Se aisló una banda de 2,686 kpb del plásmido pUC19 y se acoplo a un fragmento liberado del plásmido TOPOII mediante una digestión con *Eco*RI, 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 ºC, 30 segundos a 55 ºC, y 1 minuto a 68 ºC, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 68 ºC 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 *Sph*I 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 ºC, 30 segundos a 60 ºC, y 1 minuto a 68 ºC, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 68 ºC 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 ºC, 30 segundos a 47 ºC, y 1 minuto a 68 ºC, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 68 ºC utilizando la ADN polimerasa *Pfx*. El producto final se clonó en un vector TOPOII (Invitrogen, CA) y se digirió con *Sph*I 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 *Sph*I (de antes) para formar un plásmido de aproximadamente 4,682 kpb denominado pCM21 (figura 20).

El plásmido pCM21 se digirió con *Sac*I/*Xba*I 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 *Sac*I/*Spe*I. 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 delecionar el gen de xilitol deshidrogenasa

Una única colonia de la cepa CD805 se tranformó 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 ºC 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 ºC, 35 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 30 segundos a 50 ºC, 1 minuto a 72 ºC, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 72 ºC 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 delecionado 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 marcada CD806. La cepa CD806 tiene actividad del gen *ScXKS1* sobreexpresada, y genes de la xilosa deshidrogenasa (*KmXYL2*) y de la xilosa reductasa (*KmXYL1*) delecionados.

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 ºC, 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 ± 1,6 mU/mg, mientras que la actividad de la cepa CD806 fue de 0,0 ± 0,1 mU/mg. Estos resultados indican que la actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa se ha delecionado 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 deleciones 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 *Nae*I utilizando métodos de electroporación convencionales. Los transformantes se cultivaron a 37 ºC 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 deleciones 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 ºC, 30 segundos a 55 ºC, 1,5 minutos a 72 ºC, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 72 ºC utilizando la ADN polimerasa *Pfx*. El producto de la PCR se digirió con *Sbf*I 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 1I, figura 9) con *Sbf*I 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 *Pvu*II/*Sph*I 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 ºC 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 ºC, 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 Biosciencies, Piscataway, NJ). Una disolución de ensayo que consistía en TES-NaOH 100 mM, xilosa 250 mM, $MgCl_2$ 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 nº 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, $MgCl_2$ 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 $MgCl_2$ 10 mM, a pH 7,0. Las células se colocaron en un matraz de agitación amortiguado de 250 ml y se colocaron a 30 ºC 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 $MgCl_2$ 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 ºC 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. La 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 *Sph*I mientras que se eliminan las repeticiones HisG flanqueantes. El termociclado se realizó con un ciclo inicial de 10 minutos a 94 ºC, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 30 segundos a 45 ºC, 1,4 minutos a 72 ºC, seguido de una incubación final durante 8 minutos a 72 ºC utilizando la enzima ADN polimerasa Taq (Qiagen, EEUU). El plásmido resultante se digirió con *Sph*I 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 *Sph*I 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)

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 ºC. A partir de este cultivo se inocularon 3 gcdw en YP (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l) con xilosa 50 g/l y $CaCO_3$ 23 g/l en matraces de agitación (microaerobios) y botellas de vidrio de 250 ml (anaerobias). Los matraces se incubaron a 42 ºC 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

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 *Sph*I 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 *Sph*I, 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 *Sph*I, 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 *Sph*I 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)

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.

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.

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)

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 ºC 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, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7,0) hasta una DO de 0,2. Los tubos se colocaron a 37 ºC 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 *Sac*II. El producto de la PCR resultante se digirió con *Sac*II 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 *Pvu*II 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 ºC. 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 ºC. Se recolectaron 2 gcdw 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, $MgCl_2$ 10 mM, y $CaCO_3$ 7,5 g/l. Los matraces se pusieron en producción a 35 ºC 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-EEUU). 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 *Nae*I y *Pvu*II 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 ºC y 250 rpm. Las células se recolectaron y se inocularon 4 gcdw en 50 ml de YPX. El matraz se incubó a 35 ºC 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 una 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 *Sac*II. El producto resultante de la PCR se digirió con *Sac*II 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 *Bst*BI y *Sbf*I 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 *Pvu*II 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 ºC. 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 ºC durante 48 horas. Se recolectó 1 gcdw 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, $MgCl_2$ 10 mM, y $CaCO_3$ 7,5 g/l. Los matraces se pusieron en producción a 35 ºC y agitación a 70 rpm. La cepa CD861 (ejemplo 8B) se cultiva de modo similar, utilizando 2 gcdw, 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 gcdw). 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-EEUU). Se añadieron 100 μl de una dilución del extracto celular a una parte alícuota de 900 μl de una disolución de fosfato de odio 100 mM, D-xilosa 0,5 M y NADPH 0,2 mM equilibrada a 37 ºC. 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 una 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 secuencia 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 *Sac*I y *Not*I. El producto resultante de la PCR se digirió con *Sac*II y *Not*I, 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 *Sca*I y *Xmn*I 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 *Pvu*II 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 ºC. 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 ºC durante 48 horas. Se recolectaron 4 gcdw 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, $MgCl_2$ 10 mM, y $CaCO_3$ 7,5 g/l. Los matraces se pusieron en producción a 35 ºC 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 deleción 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 nº 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 ^{32}P-dCTP utilizando el kit de marcaje de cebado aleatorio (Boehringer Mannheim). La hibridación se realizó mediante una incubación durante la noche a 55 ºC 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 ºC 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 *Sac*I y *Sal*I 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).

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 *Apa*I. 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 *Apa*I. 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*

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.

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).

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 *Apa*I. 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 *Apa*I. El plásmido resultante se denominó pMI412 (figura 31).

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

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.

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).

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 deleción de *CsXDH* en la transformación de *C. sonorensis*

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.

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 aisla 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 aisla en gel y se acopla al fragmento de 6505 pb. El plásmido resultante se denomina pMI423.

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*.

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:

- 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*

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 deleción del gen *CsXR* mediante una transformación con el plásmido pMI417 (ejemplo 13C, figura 33)

El plásmido pMI417 se digiere con *Sac*I y *Apa*I y se utiliza para tranformar 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 deleción 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 deleción de *CsXR*. La cepa Cs/417-201 contiene dos copias del gen *PXYLA* pero no la deleción de *CsXR*. La cepa Cs/417-208 contiene una única copia del gen *PXYLA* y no tiene la deleción de *CsXR*.

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 deleción del *CsXR,* y con (A) y sin (B) la deleción del gen *CsXDH*, mediante la transformación de Cs/417-214 (ejemplo 13F) con el plásmido pMI425 (ejemplo 13D, figura 34)

El plásmido pMI425 se digiere con *Pme*I y *Psp*OMI y se utiliza para tranformar 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 deleción del gen *CsXDH*. Una cepa que tiene dos copias del gen *PXYLA* reconstruido, una copia del gen *ScXKS1*, una deleción del gen *CsXR*, y una deleción 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 deleción del gen *CsXR* pero no tiene deleción del gen *CsXDH* se denomina Cs/417-214/425B.

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)

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.

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)

El plásmido pMI425 se digirió con *Sal*I y *Not*I 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 deleción del gen *CsXR*

El plásmido pMI417 (figura 13C, figura 33) se digiere con *Sac*I y *Apa*I 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 deleción 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 deleción de *CsXR*.

Ejemplo 13K: Generación de cepas mutantes de *C. sonorensis* que contienen el gen *PXYLA* reconstruido, el gen *ScXKS1*, un gen LDH, una deleción del gen *CsXR* y con (C29/417-9/425-11) y sin (C29/417-9/425-9) la deleción 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 *Pme*I y *Apa*I 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 deleción de *CsXDH*. Los transformantes con y sin la deleciónde *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[1]	XK[2]	XR[3]	XDH[4]	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[1]	XK[2]	XR[3]	XDH[4]	Actividad XI (mU/mg)	Actividad XK (mU/mg)
C29/403-7	13H	2	0	+	+	90	N.D.[5]
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[1] = gen *PXYLA*; XK[2] = gen *ScXKS1*; XR[3] = gen de la xilosa reductasa nativo; XDH[4] = 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 deleción del gen nativo. N.D.[5]: no determinado.

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

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 ºC. Se recogieron muestras de sobrenadante para la medición de las actividades.

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, $MgCl_2$ 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 ºC durante 0 y 240 segundos. Después de la incubación, las reacciones se detuvieron mediante su incubación a 95 ºC durante 5 min. Después de que la reacción se detuviese se añadió HEPES 40 mM/KOH, pH 7,5, $MgCl_2$ 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.

Se determinó la actividad xilosa isomerasa controlando la oxidación del NADH a 340 nm a 30 ºC. La reacción contiene (además de la muestra) TES 100 mM-NaOH, pH 7,0, xilosa 250 mM, $MgCl_2$ 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).

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.

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)

Se inocularon 50 ml de YP (extracto de levadura 10 g/l y peptona 20 g/l) + glucosa al 5% + $MgCl_2$ 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 ºC. Se retiró una parte alícuota de 5 ml para los ensayos de XI, XK y proteínas. Se midió la DO_{600} y se recogió una cantidad de células equivalente a DO_{600} = 12 (que corresponde a 4 g/l de peso seco celular) (DO_{600} = 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% + $MgCl_2$ 10 mM. Las células resuspendidas se trasladaron a un matraz de 250 ml que contenía 1,2 g de $CaCO_3$. Los cultivos se incubaron a 30 ºC 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_{600}. La fermentación se realizó a aproximadamente 11 días.

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.

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.

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% + $MgCl_2$ 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 ºC. Se retiró una parte alícuota de 5 ml para los ensayos de XI, XK y proteínas. Se midió la DO_{600} y se recogió una cantidad de células equivalente a DO_{600} = 12 (que corresponde a 4 g/l de peso seco celular) (DO_{600} = 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% + $MgCl_2$ 10 mM + $CaCO_3$ 24 g/l. Los cultivos se incubaron a 30 ºC 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_{600}. El cultivo continuó durante 15 días.

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.

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 rendimientode 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 condiones 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.

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.

Al final de los cultivos, se siembran en estrías células de cada matraz en placas de YP + xilosa y de YP + glucosa, y se incuba 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.

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.

Bajo estas condiciones microaerobias, la cepa 246-27 consume xilosa con más rapidez que las otras cepas. Las cepas C29/417-4, C20/417-425-9 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 *Cyllamyces aberensis* (*CaXYLA*)

El ADN de *Cyllamyces 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 *Sbf*I. 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 ºC, 30 segundos a 45 ºC, y 1 minuto a 72 ºC con una extensión final de 8 minutos a 72 ºC. 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 ºC, 15 ciclos de 30 segundos a 95 ºC, 30 segundos a 55 ºC, y 2 minutos a 68 ºC, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95 ºC y 2,5 minutos a 68 ºC, terminando con un ciclo de generación de extremos romos de 68 ºC 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 *Sph*I y la región de *KmURA3* de aproximadamente 1,8 kpb se aisla 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 1I, figura 9). El plásmido resultante (pSO91, figura 35) contiene el gen de selección *KmURA3*, el promotor *KmPDC1*, un sitio *Sbf*I, y el terminador *ScCYC1*.

El plásmido que contiene *CaXYLA* anterior se digirió y se aisla 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 *Aat*II y *Bsm*BI (sin limpiar). Se cultivaron 100 μl de células sobre placas SC-Ura y se dejaron crecer a 37 ºC 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 ºC 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, $CaCO_3$ 7,5 g/l, y $MgCl_2$ 10 mM. Los tubos se cultivaron de modo anaerobio durante 65 horas a 30 ºC 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 Washingon (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 ºC durante 3 minutos; 15 ciclos de 30 segundos a 95 ºC, 30 segundos a 60 ºC, y 2 minutos a 68 ºC, seguido d e 20 ciclos de 30 segundos a 95 ºC, y 2,5 minutos a 68 ºC, terminando con un ciclo de generación de extremos romos de 68 ºC 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 *Sbf*I 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 *Aat*II y *Bsm*BI antes de la integración. Se cultivaron 100 μl de células en placas Sc-Ura y se dejaron crecer a 37 ºC 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 ºC, 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 nº 78990). Se determinó la proteína total utilizando el reactivo Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton nº 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)

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 ºC, 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, $CaCO_3$ 7,5 g/l, y $MgCl_2$ 10 mM. Estos cultivos se incubaron a 30 ºC 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

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 ºC 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.

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

Las cepas CD804, CD805 y CD806 se inocularon por separado a una DO_{600} de 0,1 en placas de agar YPD y se cultivaron durante 16 horas a 33 ºC 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 ºC 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 ºC 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.

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. cerevisiea* 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.

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

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 *Pac*I y *Mlu*I. Las condiciones de termociclado fueron una incubación inicial de 94 ºC durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 ºC durante 30 segundos, 50 ºC durante 30 segundos, y 70 ºC durante 3 minutos. A esto le siguió una incubación final a 70 ºC 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 *Eco*RI y *Sbf*I, 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.

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 ºC 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 ºC 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 ºC 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 gcdw 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, $CaCO_3$ 7,5 g/l, $MgCl_2$ 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.

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.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NatureWorks LLC
RAJGARHIA, Vineet
MILLER, Chris
KOIVURANTA, Kari
OLSON, Stacey
PENTTILÄ, Merja
ILMÉN, Marja
SUOMINEN, Pirkko
ARISTIDOU, Aristos
Ruohonen, Lauro

<120> Especies de levadura genéticamente modificadas, y procesos de fermentación que emplean levaduras genéticamente modificadas

<130> 1182A WO

<150> documento US 60/467.727
<151> 02-05-2003

<160> 167

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 816
<212> ADN
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

```
atcgattaat tttttttct ttcctctttt tattaacctt aatttttatt ttagattcct     60
gacttcaact caagacgcac agatattata acatctgcac aataggcatt tgcaagaatt    120
actcgtgagt aaggaaagag tgaggaacta tcgcatacct gcatttaaag atgccgattt    180
gggcgcgaat cctttatttt ggcttcaccc tcatactatt atcagggcca gaaaaaggaa    240
gtgtttccct ccttcttgaa ttgatgttac cctcataaag cacgtggcct cttatcgaga    300
aagaaattac cgtcgctcgt gatttgtttg caaaaagaac aaaactgaaa aaacccagac    360
acgctcgact tcctgtcttc ctattgattg cagcttccaa tttcgtcaca caacaaggtc    420
ctagcgacgg ctcacaggtt ttgtaacaag caatcgaagg ttctggaatg gcgggaaagg    480
gtttagtacc acatgctatg atgcccactg tgatctccag agcaaagttc gttcgatcgt    540
actgttactc tctctctttc aaacagaatt gtccgaatcg tgtgacaaca acagcctgtt    600
ctcacacact cttttcttct aaccaagggg gtggtttagt ttagtagaac ctcgtgaaac    660
ttacatttac atatatataa acttgcataa attggtcaat gcaagaaata catatttggt    720
cttttctaat tcgtagtttt tcaagttctt agatgctttc tttttctctt ttttacagat    780
catcaaggaa gtaattatct actttttaca acaaag                              816
```

<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 tatgctattt tttaaatttg gagttcagtg ataaaagtgt cacagcgaat 240
ttcctcacat gtagggaccg aattgtttac aagttctctg taccaccatg gagacatcaa 300
aaattgaaaa tctatggaaa gatatggacg gtagcaacaa gaatatagca cgagccgcgg 360
atttatttcg ttacgc 376

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

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

<400> 3

ccatcgataa caagctcatg caaagag 27

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

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

<400> 4

gctctagatt tgactgtgtt attttgcg 28

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

<400> 5

aacaagctca tgcaaagagg tggtacccgc acgccgaaat gcatgcaagt aacctattca 60
aagtaatatc tcatacatgt ttcatgaggg taacaacatg cgactgggtg agcatatgtt 120
ccgctgatgt gatgtgcaag ataaacaagc aaggcagaaa ctaacttctt cttcatgtaa 180
taaacacacc ccgcgtttat ttacctatct ctaaacttca acaccttata tcataactaa 240
tatttcttga gataagcaca ctgcacccat accttcctta aaaacgtagc ttccagtttt 300
tggtggttcc ggcttccttc ccgattccgc ccgctaaacg catatttttg ttgcctggtg 360
gcatttgcaa aatgcataac ctatgcattt aaaagattat gtatgctctt ctgacttttc 420
gtgtgatgag gctcgtggaa aaaatgaata atttatgaat ttgagaacaa ttttgtgttg 480
ttacggtatt ttactatgga ataatcaatc aattgaggat tttatgcaaa tatcgtttga 540
atatttttcc gaccctttga gtacttttct tcataattgc ataatattgt ccgctgcccc 600
tttttctgtt agacggtgtc ttgatctact tgctatcgtt caacaccacc ttattttcta 660
actatttttt ttttagctca tttgaatcag cttatggtga tggcacattt ttgcataaac 720
ctagctgtcc tcgttgaaca taggaaaaaa aaatatataa acaaggctct ttcactctcc 780

ttgcaatcag atttgggttt gttcccttta ttttcatatt tcttgtcata ttcctttctc 840
aattattatt ttctactcat aacctcacgc aaaataacac agtcaaaaac aagctcatgc 900
aaagaggtgg tacccgcacg ccgaaatgca tgcaagtaac ctattcaaag taatatctca 960
tacatgtttc atgagggtaa caacatgcga ctgggtgagc atatgttccg ctgatgtgat 1020
gtgcaagata aacaagcaag gcagaaacta acttcttctt catgtaataa acacaccccg 1080
cgtttattta cctatctcta aacttcaaca ccttatatca taactaatat ttcttgagat 1140
aagcacactg cacccatacc ttccttaaaa acgtagcttc cagtttttgg tggttccggc 1200
ttccttcccg attccgcccg ctaaacgcat atttttgttg cctggtggca tttgcaaaat 1260
gcataaccta tgcatttaaa agattatgta tgctcttctg acttttcgtg tgatgaggct 1320
cgtggaaaaa atgaataatt tatgaatttg agaacaattt tgtgttgtta cggtatttta 1380
ctatggaata atcaatcaat tgaggatttt atgcaaatat cgtttgaata tttttccgac 1440
cctttgagta cttttcttca taattgcata atattgtccg ctgccccttt ttctgttaga 1500
cggtgtcttg atctacttgc tatcgttcaa caccacctta ttttctaact atttttttt 1560
tagctcattt gaatcagctt atggtgatgg cacatttttg cataaaccta gctgtcctcg 1620
ttgaacatag gaaaaaaaaa tatataaaca aggctctttc actctccttg caatcagatt 1680
tgggtttgtt ccctttattt tcatatttct tgtcatattc ctttctcaat tattattttc 1740
tactcataac ctcacgcaaa ataacacagt caaa 1774

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

<220>
<223> Fragmento de restricción con el promotor de PKG1 y el terminador GAL10

<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 ctccttcttg aattgatgtt accctcataa   300
agcacgtggc ctcttatcga gaaagaaatt accgtcgctc gtgatttgtt tgcaaaaaga   360
acaaaactga aaaaacccag acacgctcga cttcctgtct tcctattgat tgcagcttcc   420
aatttcgtca cacaacaagg tcctagcgac ggctcacagg ttttgtaaca agcaatcgaa   480
ggttctggaa tggcgggaaa gggtttagta ccacatgcta tgatgcccac tgtgatctcc   540
agagcaaagt tcgttcgatc gtactgttac tctctctctt tcaaacagaa ttgtccgaat   600
cgtgtgacaa caacagcctg ttctcacaca ctcttttctt ctaaccaagg gggtggttta   660
gtttagtaga acctcgtgaa acttacattt acatatatat aaacttgcat aaattggtca   720
atgcaagaaa tacatatttg gtcttttcta attcgtagtt tttcaagttc ttagatgctt   780
tctttttctc ttttttacag atcatcaagg aagtaattat ctacttttta caacaaatct   840
agaattcgga tccggtagat acattgatgc tatcaatcaa gagaactgga aagattgtgt   900
aaccttgaaa aacggtgaaa cttacgggtc caagaccctc tacagatttt cctgatttgc   960
cagcttacta tccttcttga aaatatgcac tctatatctt ttagttctta attgcaacac  1020
atagatttgc tgtataacga attttatgct atttttttaaa tttggagttc agtgataaaa  1080
gtgtcacagc gaatttcctc acatgtagga ccgaattgtt tacaagttct ctgtaccacc  1140
atggagacat caaagattga aaatctatgg aaagatatgg acggtagcaa caagaatata  1200
gcacgagccg cggatttatt tcgttacgca tgcgc                             1235
```

<210> 7
<211> 1314
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Fragmento de restricción que contiene el promotor de PDC1 y el terminador GAL10

<400> 7

ggccgcggat cgctcttccg ctatcgataa caagctcatg caaagaggtg 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 gcacccatac 300
cttccttaaa aacgtagctt ccagtttttg gtggttccgg cttccttccc gattccgccc 360
gctaaacgca tatttttgtt gcctggtggc atttgcaaaa tgcataacct atgcatttaa 420
aagattatgt atgctcttct gacttttcgt gtgatgaggc tcgtggaaaa aatgaataat 480
ttatgaattt gagaacaatt ttgtgttgtt 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
ttcatatttc ttgtcatatt cctttctcaa ttattatttt ctactcataa cctcacgcaa 900
aataacacag tcaaatctag aattcggatc cggtagatac attgatgcta tcaatccaga 960
gaactggaaa gattgtgtag ccttgaaaaa cggtgaaact tacgggtcca agattgtcta 1020
cagattttcc tgatttgcca gcttactatc cttcttgaaa atatgcactc tatatctttt 1080
agttcttaat tgcaacacat agatttgctg tataacgaat tttatgctat tttttaaatt 1140
tggagttcag tgataaaagt gtcacagcga atttcctcac atgtagggac cgaattgttt 1200

acaagttctc tgtaccacca tggagacatc aaaaattgaa aatctatgga aagatatgga 1260
cggtagcaac aagaatatag cacgagccgc ggatttattt cgttacgcat gcgc 1314

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

<220>
<223> Cebador de amplificación de G418

<400> 8
gctctagatg agccatattc aacgggaaac 30

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

<220>
<223> Cebador de amplificación de G418

<400> 9
atggatcctt agaaaaactc atcgagcatc 30

<210> 10
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 5' de PDC de *K. marxianus*

<400> 10
caagaaggta cccctctcta aacttgaaca 30

<210> 11
<211> 32
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 5' de PDC1 de *K. marxianus*

<400> 11
gtaattcctg caggtgcaat tatttggttt gg 32

<210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 3' de PDC de *K. marxianus*

<400> 12
ccaagccctg caggagaggg agaggataaa ga 32

<210> 13
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 3' de PDC de *K. marxianus*

<400> 13
ctcgtaacgc gtgtacaagt tgtggaacaa 30

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación, con sitios de clonación multiple y terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

<400> 14
atcctgcagg taatacgact cactataggg 30

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

<220>
<223> Cebador de amplificación, con sitios de clonación múltiple y terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

<400> 15
tagagacgag cttgcaaatt aaagccttcg 30

<210> 16
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación con terminador ScCYC1 y marcador de poli-his

<400> 16
atattaacct gcaggacatc atcaccatca ccattgagtt 40

<210> 17
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación con terminador ScCYC1 y marcador de poli-his

<400> 17
gaggaagcgg aagagcgccc aata 24

<210> 18
<211> 29
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de resistencia a la higromicina

<400> 18
aagctctaga tgaaaaagcc tgaactcac 29

<210> 19
<211> 29
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de resistencia a la higromicina

<400> 19
cgcggatccc tattcctttg ccctcggac 29

<210> 20
<211> 60
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 20
agcgtgaaaa ggaacacatg gccactatgc ttaccatggc tcgtgactac gctcgttcca 60

<210> 21
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 21
ggttccattg gctttggttc aatgaggaaa gtacccttga atcccttgga acgagcgtag 60
tc 62

<210> 22
<211> 55
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 22
ggtcgtgaag gttacatgag tctccttaac actgaccaaa agcgtgaaaa ggaac 55

<210> 23
<211> 52
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 23
gcggtttcag tgtcaacatc gtattggtgc ttggttggtt ccattggctt tg 52

<210> 24
<211> 60
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 24
gacgccggta ttgaacttgg tgctgaaaac tacgtcttct ggggtggtcg tgaaggttac 60

<210> 25
<211> 60
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 25

ccttgaagtc cttgtctaag ttgtgggcct taaggaaacc aatagcggtt tcagtgtcaa 60

<210> 26
<211> 63
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 26
gactttgatg ttgtcgcccg tgctattgtt caaattaaga acgccataga cgccggtatt 60
gaa 63

<210> 27
<211> 63
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 27
gttcgaaagt gtgaccagca agagtagcgt ggttaacttc aatgttgacc ttgaagtcct 60
tgt 63

<210> 28
<211> 63
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 28
acgtcttcgg tcacaagcgt tacatgaacg gtgcctccac taacccagac tttgatgttg 60
tcg 63

<210> 29
<211> 65
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 29
agcatcaatg gaaccgagca taccagcatc aacagcacag gcaagttcgt gttcgaaagt 60
gtgac 65

<210> 30
<211> 65
<212> ADN
<213> artificial

<220>

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

<400> 30

caaggaaaag caaaaggaaa ccggtattaa gcttctctgg agtactgcta acgtcttcgg 60

tcaca 65

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

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

<400> 31

tcaattggga attgatcagt atcccaaccg ttttggtagt caccacggtt agcatcaatg 60

gaaccg 66

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

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

<400> 32

ctctattgaa gaatacgaat ccaaccttaa ggctgtcgtt gcttacctca aggaaaagca 60

aaag 64

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

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

<400> 33

ccaccaccac ggatgatttc catccaagct tggacgagtt cgtattgatc aattgggaat 60

tgat 64

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

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

<400> 34

atactactgt ttccacgatg ttgatcttgt ttccgaaggt aactctattg aagaatacga 60

<210> 35
<211> 66
<212> ADN

<213> artificial

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

<400> 35

agtagagtta cgacgagtct tggcatcgaa gttggtacca ccagtaacga aaccaccacc 60

acggat 66

<210> 36
<211> 45
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 36

gaaatcatgc aaaagcttgg tattccatac tactgtttcc acgat 45

<210> 37
<211> 56
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 37

gtgggcaatg atgatgtctt cgaggtcagt agagttacga cgagtcttgg catcga 56

<210> 38
<211> 56
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 38

tgaaattgcc aagcaaaagg ttgatgctgg tttcgaaatc atgcaaaagc ttggta 56

<210> 39
<211> 51
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 39

gagccatagc atccatacca gaaacgtggg caatgatgat gtcttcgagg t 51

<210> 40
<211> 63
<212> ADN
<213> artificial

<220>

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

<400> 40

caaaaggttg atgctggttt cgaaatcatg caaaagcttg gtattccata ctactgtttc 60

cac 63

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

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

<400> 41

gccatagcat ccataccaga aacgtgggca atgatgatgt cttcgaggtc agtagagtta 60

cgacgag 67

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

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

<400> 42

gtacaaagtc tttcccatgg aacgaaggta ctgatgctat tgaaattgcc aagcaaaagg 60

ttgatgct 68

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

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

<400> 43

gtatggagat tcttggagga gcttggcagc gttttcaaga gcacgagcca tagcatccat 60

a 61

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

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

<400> 44

ggtggcacac tctttgcgcc gaaggtgctg accaattcgg tggaggtaca aagtctttcc 60

c 61

<210> 45
<211> 60
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 45

ataccactgt cgaaggaagc gtaacgttcc ttcttcatct tggtgtatgg agattcttgg 60

<210> 46
<211> 55
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 46

gtaagaaaat gaaggattgg ttacgtttcg ccatggcctg gtggcacact ctttg 55

<210> 47
<211> 55
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 47

gtgagcttac catcttcaaa gtccttacca ataccactgt cgaaggaagc gtaac 55

<210> 48
<211> 50
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 48

ctacgatgct gaaaaggaag tcatgggtaa gaaaatgaag gattggttac 50

<210> 49
<211> 55
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 49

ttaccgtatt cgtaaacttg ttcgagggtg agcttaccat cttcaaagtc cttac 55

<210> 50
<211> 60

<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 50
ggattctaag aatccattag ccttccacta ctacgatgct gaaaaggaag tcatgggtaa 60

<210> 51
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 51
gcttaccaga agtttgcttt ggttcaccgt tcttcttacc gtattcgtaa acttgttcga 60
gg 62

<210> 52
<211> 65
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 52
atggctaagg aatatttccc acaaattcaa aagattaagt tcgaaggtaa ggattctaag 60
aatcc 65

<210> 53
<211> 55
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 53
ttattggtac atggcaacaa tagcttcgta gagttcttgc ttaccagaag tttgc 55

<210> 54
<211> 35
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador mutagénico de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 54
ggattggtta cgtttcgcca tggcctggtg gcaca 35

<210> 55
<211> 35
<212> ADN
<213> artificial

<220>

<223> Cebador mutagénico de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 55
ctatgcttac catggctcgt gactacgctc gttcc 35

<210> 56
<211> 39
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador mutagénico de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 56
gctggtatgc tcggttccat tgatgctaac cgtggtgac 39

<210> 57
<211> 35
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador mutagénico de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 57
gttgcttacc tcaaggaaaa gcaaaaggaa accgg 35

<210> 58
<211> 1314
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Gen de la xilosa isomerasa de *Piromyces* sp. E2 reconstruido

<400> 58

```
atggctaagg aatatttccc acaaattcaa aagattaagt tcgaaggtaa ggattctaag     60
aatccattag ccttccacta ctacgatgct gaaaaggaag tcatgggtaa gaaaatgaag    120
gattggttac gtttcgccat ggcctggtgg cacactcttt gcgccgaagg tgctgaccaa    180
ttcggtggag gtacaaagtc tttcccatgg aacgaaggta ctgatgctat tgaaattgcc    240
aagcaaaagg ttgatgctgg tttcgaaatc atgcaaaagc ttggtattcc atactactgt    300
ttccacgatg ttgatcttgt ttccgaaggt aactctattg aagaatacga atccaacctt    360
aaggctgtcg ttgcttacct caaggaaaag caaaaggaaa ccggtattaa gcttctctgg    420
agtactgcta acgtcttcgg tcacaagcgt tacatgaacg gtgcctccac taacccagac    480
tttgatgttg tcgcccgtgc tattgttcaa attaagaacg ccatagacgc cggtattgaa    540
cttggtgctg aaaactacgt cttctggggt ggtcgtgaag gttacatgag tctccttaac    600
actgaccaaa agcgtgaaaa ggaacacatg gccactatgc ttaccatggc tcgtgactac    660
gctcgttcca agggattcaa gggtactttc ctcattgaac caaagccaat ggaaccaacc    720
aagcaccaat acgatgttga cactgaaacc gctattggtt tccttaaggc ccacaactta    780
gacaaggact tcaaggtcaa cattgaagtt aaccacgcta ctcttgctgg tcacactttc    840
gaacacgaac ttgcctgtgc tgttgatgct ggtatgctcg gttccattga tgctaaccgt    900
ggtgactacc aaaacggttg ggatactgat caattcccaa ttgatcaata cgaactcgtc    960
caagcttgga tggaaatcat ccgtggtggt ggtttcgtta ctggtggtac caacttcgat   1020
gccaagactc gtcgtaactc tactgacctc gaagacatca tcattgccca 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 gctattgttg ccatgtacca ataa         1314
```

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

<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

<210> 60
<211> 42
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 60
atcgtattcc tgcaggatgg ctaaggaata tttcccacaa at 42

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

<220>
<223> Cebador de amplificación de la xilosa isomerasa de *Piromyces*

<400> 61
atatcgaacc tgcaggttat tggtacatgg caacaatagc ttcg 44

<210> 62
<211> 43
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 62
gctattgttg ccatgtacca acctgcagga catcatcacc atc 43

<210> 63
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para el flanco cadena arriba del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 63
aggtaatata ggtaaacaaa gatcac 26

<210> 64
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para el flanco cadena arriba del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 64
tatgtatgtg tgtgctactt accacag 27

<210> 65
<211> 28
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para el flanco cadena abajo del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 65
cctggaattt tcatgaaact gatataag 28

<210> 66
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para el flanco cadena abajo del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 66
actaaactcg ctttgttctg gctcatc 27

<210> 67
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 67
gccagaggta gagagcacaa agtaa 25

<210> 68
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 68
cgaagccaac tcgcttctat ctggt 25

<210> 69
<211> 31
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región promotora de *K. marxianus*

<400> 69
tattactgca gtgcacccga aaagtttgag a 31

<210> 70
<211> 31
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región promotora de *K. marxianus*

<400> 70
atcgtctgca gactacacca gggcgtagta t 31

<210> 71
<211> 41

<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región terminadora de *K. marxianus*

<400> 71
cgtagtatct gggccctatc tggtattatc taagaacgat t 41

<210> 72
<211> 43
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región terminadora de *K. marxianus*

<400> 72
tatacgtact tagggcccgc tatgcccctc actttactaa tat 43

<210> 73
<211> 16
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región promotora de *K. marxianus*

<400> 73
cgtagtatct gggccc 16

<210> 74
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región promotora de *K. marxianus*

<400> 74
tatacgtact tagggccc 18

<210> 75
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región promotora de *K. marxianus*

<400> 75
caggacttgt tgcgtggcgc 20

<210> 76
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región promotora de *K. marxianus*

<400> 76

gtatagatta acagtgtgtt 20

<210> 77
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para la región promotora de *K. marxianus*

<400> 77
ccacgagcct catcacacga aaagt 25

<210> 78
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen G418

<400> 78
gtcttcgatt tgacctactt ctaccag 27

<210> 79
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen G418

<400> 79
cgtaatagcg aagaggcccg cacc 24

<210> 80
<211> 28
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen G418

<400> 80
atccgttctc aatcactaca gtagctta 28

<210> 81
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para el gen de xiluloquinasa de *S. cerevisiae*

<400> 81
taggatccat gttgtgttca gtaattcaga 30

<210> 82
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación para el gen de xiluloquinasa de *S. cerevisiae*

<400> 82
taggatcctt agatgagagt cttttccagt 30

<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 gggtctgtct actggtcctc ccaagccgaa 360
tctctgttag agcaattgaa taagaaaccg gaaaaagatt tattgcacta cgtgagctct 420
gtagcatttg caaggcaaac cgcccccaat tggcaagacc acagtactgc aaagcaatgt 480
caagagtttg aagagtgcat aggtgggcct gaaaaaatgg ctcaattaac agggtccaga 540
gcccatttta gatttactgg tcctcaaatt ctgaaaattg cacaattaga accagaagct 600
tacgaaaaaa caaagaccat ttctttagtg tctaattttt tgacttctat cttagtgggc 660
catcttgttg aattagagga ggcagatgcc tgtggtatga acctttatga tatacgtgaa 720
agaaaattca gtgatgagct actacatcta attgatagtt cttctaagga taaaactatc 780
agacaaaaat taatgagagc acccatgaaa aatttgatag cgggtaccat ctgtaaatat 840
tttattgaga agtacggttt caatacaaac tgcaaggtct ctcccatgac tggggataat 900
ttagccacta tatgttcttt acccctgcgg aagaatgacg ttctcgtttc cctaggaaca 960
agtactacag ttcttctggt caccgataag tatcacccct ctccgaacta tcatcttttc 1020
attcatccaa ctctgccaaa ccattatatg ggtatgattt gttattgtaa tggttctttg 1080
gcaagggaga ggataagaga cgagttaaac aaagaacggg aaaataatta tgagaagact 1140
aacgattgga ctctttttaa tcaagctgtg ctagatgact cagaaagtag tgaaaatgaa 1200
ttaggtgtat attttcctct gggggagatc gttcctagcg taaaagccat aaacaaaagg 1260
gttatcttca atccaaaaac gggtatgatt gaaagagagg tggccaagtt caaagacaag 1320
aggcacgatg ccaaaaatat tgtagaatca caggctttaa gttgcagggt aagaatatct 1380
cccctgcttt cggattcaaa cgcaagctca caacagagac tgaacgaaga tacaatcgtg 1440
aagtttgatt acgatgaatc tccgctgcgg gactacctaa ataaaaggcc agaaaggact 1500
ttttttgtag gtggggcttc taaaaacgat gctattgtga agaagtttgc tcaagtcatt 1560

ggtgctacaa agggtaattt taggctagaa acaccaaact catgtgccct tggtggttgt 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
<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

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
500 505 510

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
545 550 555 560

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

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

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

<400> 85
gacactatag aatactcaag cta 23

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

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

<400> 86
cgtctagatt cctcaccttg tcgtattat 29

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

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

<400> 87
tattacgtat atgcgaattc cccacacacc atagcttcaa aa 42

<210> 88
<211> 45
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 88
acgtattacg tagaattctg tcgtattata ctatgccgat atact 45

<210> 89
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 89
tattacgtat atgcgaattc 20

<210> 90
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 90
acgtattacg tagaattc 18

<210> 91
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen HisG/*S. cerevisiae*

<400> 91
ggactccgcg catcgccgta ccacttc 27

<210> 92
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen HisG/*S. cerevisiae*

<400> 92
tacgggacat tcgatagtgt 20

<210> 93
<211> 18
<212> ADN

<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen HisG/*S. cerevisiae*

<400> 93
caggaaacag ctatgacc 18

<210> 94
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen HisG/*S. cerevisiae*

<400> 94
gtagtgaaaa tgaattaggt gtat 24

<210> 95
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de xilulosaquinasa de *S. cerevisiae*

<400> 95
gttttcccag tcacgacg 18

<210> 96
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 96
accaaaaaca ctgcatagac taatattatt aatactatat 40

<210> 97
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 97
ggttgataat ttgtattttt gttattggta gcgctcgctc 40

<210> 98
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 98

catgtttcaa aactgtgatt gaacgttatt tatgaatatg 40

<210> 99
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 99
cctagggata ggttccgctc ctgttgggtt ataacgactc 40

<210> 100
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 100
atctatgcat gccatgtttc aaaactgtga ttgaacgtta 40

<210> 101
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 101
agttaagcat gccctaggga taggttccgc tcctgttggg 40

<210> 102
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 102
atctatgcat gccatgtttc 20

<210> 103
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del terminador de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 103
agttaagcat gccctaggga 20

<210> 104
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 104
atgaccaaca ctcaaaaagc cgttg 25

<210> 105
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 105
tcattctgga ccatcaatga tagtc 25

<210> 106
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de higromicina

<400> 106
atgttcacaa gatgaaatat taccc 25

<210> 107
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de higromicina

<400> 107
tgagcttgtt atcgatagcg gaaga 25

<210> 108
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de higromicina

<400> 108
gtaggaacct ttggtgccac gtaag 25

<210> 109
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de higromicina

<400> 109
ggccgcacta gagtcgacct g 21

<210> 110
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 110
tgaacggtgc ctccactaac 20

<210> 111
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 111
gccctctagg atcagcgggt 20

<210> 112
<211> 42
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 112
atcgtattcc tgcaggatgg ctaaggaata tttcccacaa at 42

<210> 113
<211> 44
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 113
atatcgaacc tgcaggttat tggtacatgg caacaatagc ttcg 44

<210> 114
<211> 33
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la lactato deshidrogenasa de *L. helveticus*

<400> 114
tattagcatg cgacgtcggt aatctccgaa cag 33

<210> 115
<211> 23
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la lactato deshidrogenasa de *L. helveticus*

<400> 115
gaaatgcatg cccacaggac ggg 23

<210> 116
<211> 37
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 116
attaatccgc gggggaaata cggacgggat tgaacgc 37

<210> 117
<211> 37
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 117
tattaaccgc ggcttattgt ggatcgaatt gtaatgt 37

<210> 118
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 118
tagcagcacg ttccttatat 20

<210> 119
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilitol deshidrogenasa de *K. marxianus*

<400> 119
ctatggtata gcgctgccta 20

<210> 120
<211> 28
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen Ura3

<400> 120
cttcaacaac aacaccactt gattcatg 28

<210> 121
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen Ura3

<400> 121
gtgcagttgg gttaagaata 20

<210> 122
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de xiluloquinasa de *S. cerevisiae*

<400> 122
gaggcagatg cctgtggtat gaacct 26

<210> 123
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de xiluloquinasa de *S. cerevisiae*

<400> 123
cgaaataaat ccgcggctcg tgct 24

<210> 124
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 124
attataccgc gggtagagag cacaaagtaa cgcaac 36

<210> 125
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 125
taatatccgc ggggctgtct tttgacaatt aggtcg 36

<210> 126
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>

<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 126
tcccctatat agatgatggc 20

<210> 127
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 127
ggtatctcaa acttttcggg tgcatt 26

<210> 128
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 128
tcccatgggt cgttaaatct caatcc 26

<210> 129
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen Ura3

<400> 129
gcccactatc ctttgtcgag 20

<210> 130
<211> 37
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 130
attatagagc tcggtagaga gcacaaagta acgcaac 37

<210> 131
<211> 38
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 131
tattaagcgg ccgcggctgt cttttgacaa ttaggtcg 38

<210> 132
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 132
aggacgtgcg cacccacctg 20

<210> 133
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 133
gtttccacca cccagacaac 20

<210> 134
<211> 23
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa reductasa de *K. marxianus*

<400> 134
caatgcaaag gtggtttatg taa 23

<210> 135
<211> 45
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 5' del gen de la xilitol deshidrogenasa de *C. sonorensis*

<400> 135
actgtcgagc tcgtttaaac acctattcgg gagtcaatca accat 45

<210> 136
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 5' del gen de la xilitol deshidrogenasa de *C. sonorensis*

<400> 136
actgacgcgt cgacgtatgt ataataaggt atgattctgg 40

<210> 137
<211> 39
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 3' del gen de la xilitol deshidrogenasa de *C. sonorensis*

<400> 137
ggcccgcggc cgctaggcta gttttctaaa attttggtg 39

<210> 138
<211> 37
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 3' del gen de la xilitol deshidrogenasa de *C. sonorensis*

<400> 138
gggacgggcc caagtatgag aaatattgat gatatag 37

<210> 139
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación de la xilosa reductasa de *C. sonorensis*

<220>
<221> característica_misc
<223> D =A/G/T; R = A/G; Y = C/T; W = A/T

<400> 139
gadgaraart ayccwccagg wttcta 26

<210> 140
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación de la xilosa reductasa de *C. sonorensis*

<220>
<221> característica_misc
<223> D =A/G/T; K = G/T; Y = C/T; W = A/T; R = A/G

<400> 140
ccadkyccaw ggrtyrttra atct 24

<210> 141
<211> 45
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 5' de la xilosa reductasa de *C. sonorensis*

<400> 141
actgtcgagc tcgtttaaac cttcacctta aattccccaa ttgag 45

<210> 142
<211> 41
<212> ADN
<213> artificial

<220>

<223> Cebador de amplificación del flanco 5’ de la xilosa reductasa de *C. sonorensis*

<400> 142
actgacgcgt cgactcttgt ttgattgtgt gttgattgat c 41

<210> 143
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 3’ de la xilosa reductasa de *C. sonorensis*

<400> 143
ggcccgcggc cgctaagcag ctagtatagg caagatgtag 40

<210> 144
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del flanco 3’ de la xilosa reductasa de *C. sonorensis*

<400> 144
gggacgggcc caactgtaat aatccgactt tcaacg 36

<210> 145
<211> 76
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 145
ggacatgcat gcatttgggg tacccaaggc cttccgctct agaaaacaat ggctaaggaa 60
tatttcccac aaattc 76

<210> 146
<211> 53
<212> ADN
<213> artificial

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

<400> 146
ccaatgcatt ggttcctgca gggaattcga caacatcaaa gtctgggtta gtg 53

<210> 147
<211> 53
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de xiluloquinasa de *S. cerevisiae*

<400> 147

aaggccttgc ggccgcctct agaaaacaat gttgtgttca gtaattcaga gac 53

<210> 148
<211> 35
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de xiluloquinasa de *S. cerevisiae*

<400> 148
gaaaaggcct tgttcaatgg aaatttagcc tcgcg 35

<210> 149
<211> 49
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de *C. aberensis*

<220>
<221> característica_misc
<223> Y = C/T; M = A/C; R = A/G; S = G/C

<400> 149
aattaattcc tgcaggatgg ttaaggaata yttcycmrmc attsraaag 49

<210> 150
<211> 47
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplificación del gen de la xilosa isomerasa de *C. aberensis*

<400> 150
aattaattcc tgcaggttac atgtacatag caacaatagc ttcgtaa 47

<210> 151
<211> 1314
<212> ADN
<213> *Cyllamyces aberensis*

<400> 151

atggttaagg aatacttccc cgccattcaa aagattaagt tcgaaggtaa ggattccaag 60
aatccaatgg ccttccacta ttacgatgct gaaaaagaaa ttatgggtaa gaagatgaag 120
gattggttac gtttcgctat ggcctggtgg cacactcttt gtgccgaagg ttctgaccaa 180
ttcggtccag gtactaagac tttcccatgg aacgaaggta ccgacccaat tgaaaaggct 240
aaacaaaagg tcgatgctgg tttcgaaatc atgaccaagc ttggtattga acactactgt 300
ttccacgatg ttgatcttgt tgatgaaggt aagaatgttg aagaatacga aaagaacctt 360
aagactatcg ttgcttacct taaggaaaag caaaaggaaa ctggtattaa acttctctgg 420
agtactgcta acgtcttcgg tcacaaacgt tacatgaacg gtgcttccac taacccagac 480
tttgatgttg ttgcccgtgc tattgttcaa attaagaacg ctatggatgc cggtattgaa 540
ctcggtgccg aaaactacgt cttctggggt ggtcgtgaag gttacatgag tctccttaac 600
actgaccaaa agcgtgaaaa ggaacacatg gctatgatgc tcggtttagc cagagattac 660
gctcgttcca agggtttcaa gggtactttc ctcattgaac caaagccaat ggaaccaacc 720
aagcaccaat acgatgttga cactgaaact gtcattggtt tcctcagagc tcatggttta 780
gacaaggact tcaagattaa cattgaagtt aaccacgcta ctcttgctgg tcacactttc 840
gaacacgaac ttgcctgtgc tgttgatgcc ggtatgctcg gttctattga tgctaaccgt 900
ggtgattacc aaaacggttg ggatactgat caattcccaa ttgaccaata cgagcttgtt 960
caagcttgga tggaaattat ccgtggtggt ggtttcacta ctggtggtac taacttcgat 1020
gccaagactc gtcgtaactc taccgatctt gaagacatca ttattgccca catttctggt 1080
atggatgcta tggctcgtgc cctcgaaaac gctgccaagc tccttaccga atctccatac 1140
aagaagatga aggctgaccg ttacgcttcc ttcgactctg gtatgggtaa ggacttcgaa 1200
gatggtaagc ttaccttcga acaagtttac gaatacggta agaaggttaa cgaaccaaaa 1260
caaacctctg gtaaacaaga actttacgaa gctattgttg ctatgtacat gtaa 1314

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

<400> 152

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

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

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

<400> 153
atatatgcat gccgtacctt agaatcctta tttgtatca 39

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

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

<400> 154
atatatgcat gctaaactct ttttctttgg ttgtgaaat 39

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

<400> 155
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 tcattatacc 240
tcaatcaaaa ctgaaattag gtgcctgtca cggctctttt tttactgtac ctgtgacttc 300
ctttcttatt tccaaggatg ctcatcacaa tacgcttcta gatctattat gcattataat 360
taatagttgt agctacaaaa ggtaaaagaa agtccggggc aggcaacaat agaaatcggc 420
aaaaaaaact acagaaatac taagagcttc ttccccattc agtcatcgca tttcgaaaca 480
agaggggaat ggctctggct agggaactaa ccaccatcgc ctgactctat gcactaacca 540
cgtgactaca tatatgtgat cgtttttaac atttttcaaa ggctgtgtgt ctggctgttt 600
ccattaattt tcactgatta agcagtcata ttgaatctga gctcatcacc aacaagaaat 660
actaccgtaa aagtgtaaaa gttcgtttaa atcatttgta aactggaaca gcaagaggaa 720
gtatcatcag ctagcccata aactaatcaa aggaggatgt cgactaagag ttactcggaa 780
agagcagctg ctcatagaag tccagttgct gccaagcttt taaacttgat ggaagagaag 840
aagtcaaact tatgtgcttc tcttgatgtt cgtaaaacaa cagagttgtt aagattagtt 900
gaggttttgg gtccatatat ctgtctattg aagacacatg tagatatctt ggaggatttc 960
agctttgaga ataccattgt gccgttgaag caattagcag agaaacacaa gtttttgata 1020

tttgaagaca ggaagtttgc cgacattggg aacactgtta aattacaata cacgtctggt 1080
gtataccgta tcgccgaatg gtctgatatc accaatgcac acggtgtgac tggtgcgggc 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 ttgttggtag aggtcttttc gcaaagggaa gagatcctgt agtggaaggt 1500
gagagataca gaaaggcggg atgggacgct tacttgaaga gagtaggcag atccgcttaa 1560
gagttctccg agaacaagca gaggttcgag tgtactcgga tcagaagtta caagttgatc 1620
gtttatatat aaactataca gagatgttag agtgtaatgg cattgcgcac attgtatacg 1680
ctacaagttt agtcacgtgc tagaagctgt ttttttgcac cgaaaatttt tttttttttt 1740
ttttttgttt tttggtgaag tacattatgt gaaatttcac aaccaaagaa aaagagttta 1800
gcatg 1805

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

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

<400> 156
agtgtattca ccgtgcgcta ga 22

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

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

<400> 157
cccattcagt catcgcattt cg 22

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

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

<400> 158
cgatgttgac actgaaactg tc 22

<210> 159
<211> 22
<212> ADN

<213> artificial

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

<400> 159
gaagtcctta cccataccag ag 22

<210> 160
<211> 42
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de aislamiento del gen de la xilosa isomerasa de *B. thetaiotaomicron*

<400> 160
aattaattcc tgcaggatgg caacaaaaga atttttccg gg 42

<210> 161
<211> 43
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de aislamiento del gen de la xilosa isomerasa de *B. thetaiotaomicron*

<400> 161
aattaattcc tgcaggttag caatacatat tcagaattgc ctc 43

<210> 162
<211> 1317
<212> ADN
<213> *Bacteroides thetaiotaomicron*

<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 ttcctgatcg aaccgaaacc gatggaaccg 720
actaaacatc aatatgacgt agatacggaa actgtaatcg gcttcctgaa agctcatggt 780
ctggataagg atttcaaagt aaatatcgag 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 tcacatcgca 1080
ggtatggacg ctatggcccg tgcactcgaa 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
<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

180 185 190

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

<210> 164
<211> 19
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de selección del gen de la xilosa isomerasa de *B. thetaiotaomicron*

<400> 164
ggcgtgaatg taagcgtga 19

<210> 165
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de selección del gen de la xilosa isomerasa de *B. thetaiotaomicron*

<400> 165
ctgtagacaa tggtatgttg g 21

<210> 166
<211> 32
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplicación con promotor de PDC de *K. marxianus*, xilosa isomerasa de *Piromyces*, y terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

<400> 166
attgttaatt aactctctaa acttgaacag cc 32

<210> 167
<211> 34
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de amplicación con promotor de PDC de *K. marxianus*, xilosa isomerasa de *Piromyces*, y terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

<400> 167
attaatacgc gtagcttgca aattaaagcc ttcg 34

REIVINDICACIONES

1.- Una célula de levadura genéticamente modificada que tiene una deleción o alteración de un gen nativo que produce una enzima que cataliza la conversión de xilosa a xilitol, y una deleción o alteración de un gen de xilitol deshidrogenasa nativo.

2.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 1, en la que el gen nativo que produce una enzima que cataliza la conversión de xilosa a xilitol es un gen de xilosa reductasa funcional.

3.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 1 o 2, que tiene también 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.

4.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 3, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno funcional está integrado en el genoma de la célula de levadura.

5.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 3 o 4, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno es al menos 60% homólogo con SEQ ID NO:151, o codifica una enzima que es al menos 60% homóloga con SEQ ID NO:152.

6.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 3 o 4, en la que el gen de xilosa isomerasa exógeno es al menos 60% homólogo con SEQ ID NO:162, o codifica una enzima xilosa isomerasa que es al menos 60% homóloga con SEQ ID NO:163.

7.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 3 o 4, en la que el gen de xilosa isomerasa es al menos 60% homólogo con SEQ ID NO:58, o codifica una enzima xilosa isomerasa que es al menos 60% homóloga con SEQ ID NO:59.

8.- La célula de levadura genéticamente modificada de la reivindicación 3 o 4, en la que la célula de levadura tiene una vía natural activa desde el xilulosa-5-fosfato al gliceraldehído-3-fosfato, en la que la célula de levadura tiene una deleción o alteración de un gen de xilosa reductasa nativo, y el gen de xilosa isomerasa es al menos 95% homólogo con SEQ ID NO:58.

9.- La célula de levadura genéticamente modificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que sobreexpresa una xiluloquinasa funcional.

10.- Un proceso de fermentación, en el que una célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 se cultiva bajo condiciones de fermentación en un caldo de fermentación que incluye un azúcar de pentosa, y en el que se produce etanol como productor principal de la fermentación.

11.- Un proceso de fermentación, en el que una célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 se cultiva bajo condiciones de fermentación en un caldo de fermentación que incluye un azúcar de pentosa, en el que el azúcar de pentosa incluye xilosa.

12.- Un proceso de fermentación, en el que una célula de levadura genéticamente modificada, que tiene un genoma y un gen de xilosa isomerasa exógeno funcional unido operativamente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, que además contiene un gen de xiluloquinasa exógeno funcional unido operativamente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura, y que además tiene una deleción o alteración de un gen de piruvato descarboxilasa nativo, se cultiva bajo condiciones de fermentación en un caldo de fermentación que incluye un azúcar de pentosa, en el que el azúcar de pentosa incluye xilosa.

Fig. 1

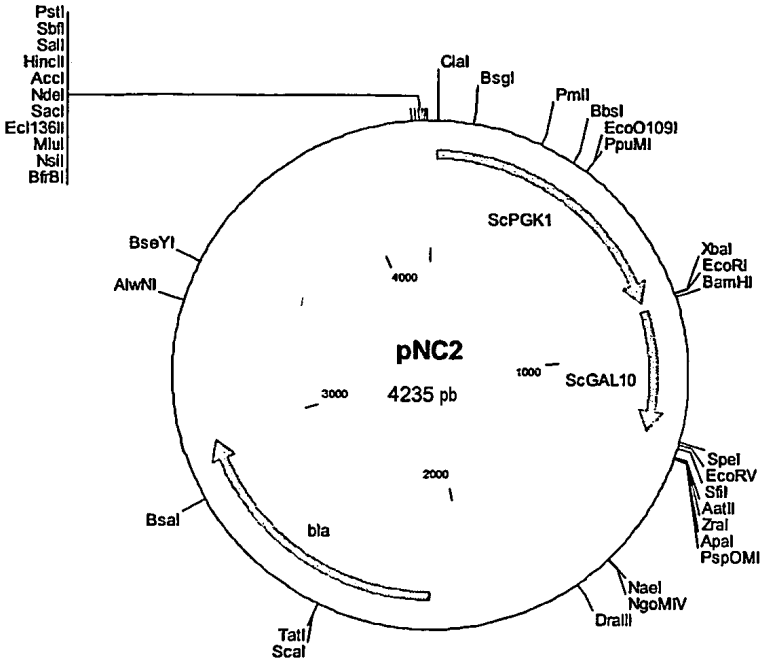

PstI
SbfI
SalI
HincII
AccI
NdeI
SacI
EcI136II
MluI
NsiI
BfrBI
ClaI
BsgI
PmlI
BbsI
EcoO109I
PpuMI
ScPGK1
XbaI
EcoRI
BamHI
BseYI
AlwNI
4000
pNC2
4235 pb
1000
ScGAL10
3000
2000
SpeI
EcoRV
SfiI
AatII
ZraI
ApaI
PspOMI
BsaI
bla
NaeI
NgoMIV
DraIII
TatI
ScaI

Fig. 2

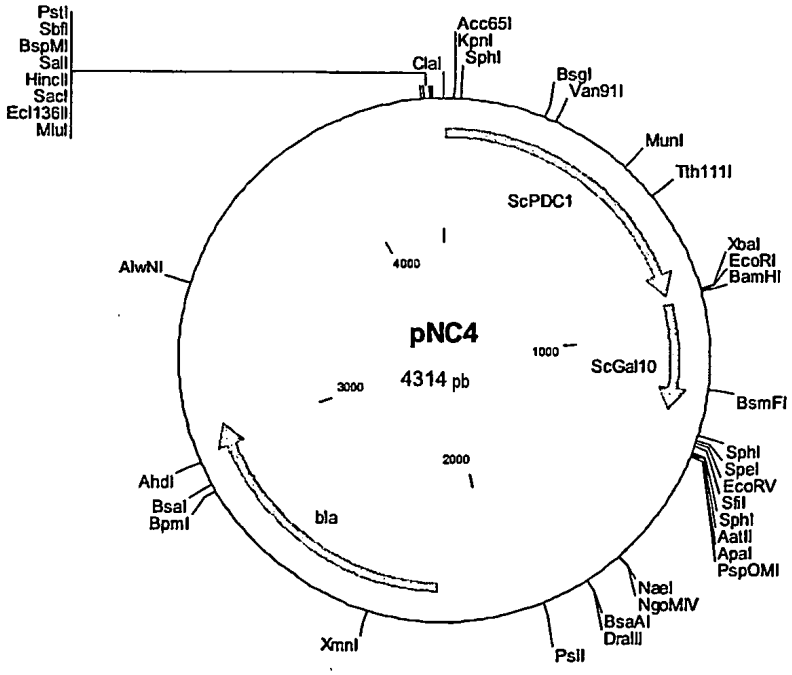

PstI
SbfI
BspMI
SalI
HincII
SacI
EcI136II
MluI
Acc65I
KpnI
SphI
ClaI
BsgI
Van91I
MunI
Tth111I
ScPDC1
XbaI
EcoRI
BamHI
AlwNI
4000
pNC4
4314 pb
1000
ScGal10
3000
BsmFI
2000
SphI
SpeI
EcoRV
SfiI
SphI
AatII
ApaI
PspOMI
AhdI
BsaI
BpmI
bla
NaeI
NgoMIV
BsaAI
DraIII
XmnI
PsiI

Fig. 3

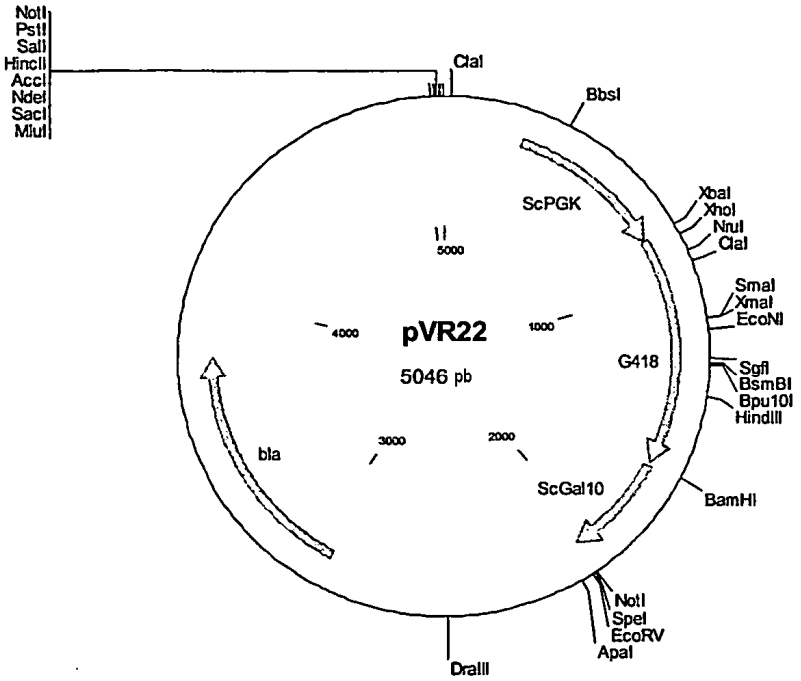

NotI
PstI
SalI
HincII
AccI
NdeI
SacI
MluI
ClaI
BbsI
ScPGK
XbaI
XhoI
NruI
ClaI
SmaI
XmaI
EcoNI
SgfI
BsmBI
Bpu10I
HindIII
BamHI
NotI
SpeI
EcoRV
ApaI
DraIII
ScGal10
G418
bla
pVR22
5046 pb
5000
1000
2000
3000
4000

Fig. 4

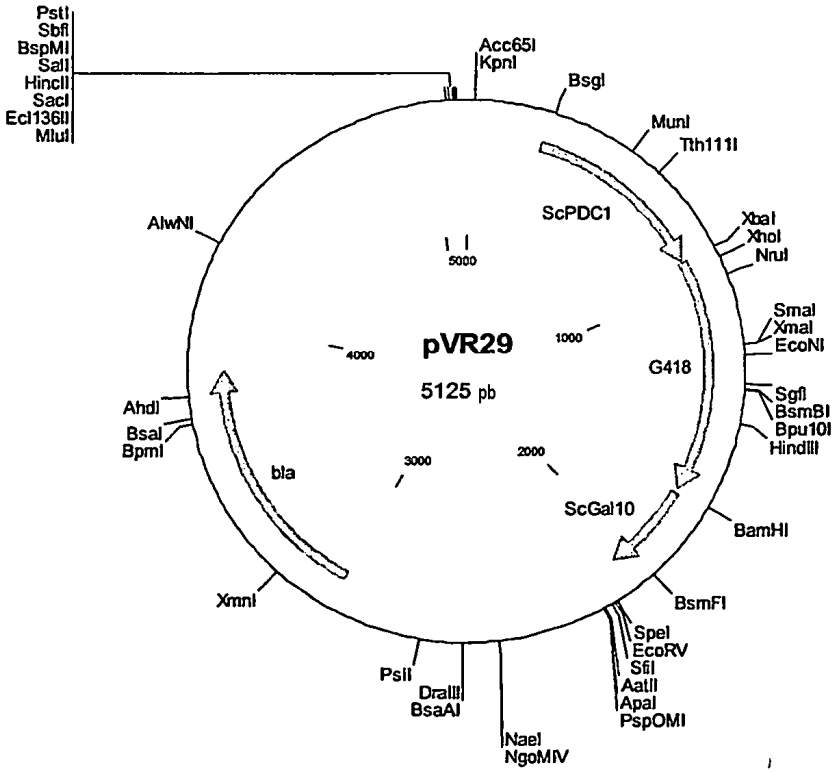

PstI
SbfI
BspMI
SalI
HincII
SacI
Ecl136II
MluI
Acc65I
KpnI
BsgI
MunI
Tth111I
ScPDC1
XbaI
XhoI
NruI
SmaI
XmaI
EcoNI
SgfI
BsmBI
Bpu10I
HindIII
BamHI
BsmFI
SpeI
EcoRV
SfiI
AatII
ApaI
PspOMI
NaeI
NgoMIV
DraIII
BsaAI
PsiI
XmnI
BpmI
BsaI
AhdI
AlwNI
bla
G418
ScGal10
pVR29
5125 pb
5000
1000
2000
3000
4000

Fig. 5A

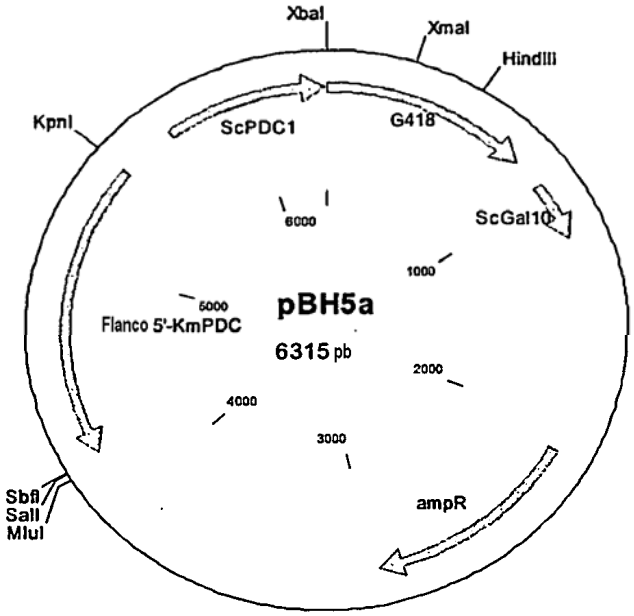

XbaI
XmaI
HindIII
KpnI
ScPDC1
G418
ScGal10
6000
1000
5000
pBH5a
Flanco 5'-KmPDC
6315 pb
2000
4000
3000
SbfI
SalI
MluI
ampR

Fig. 5B

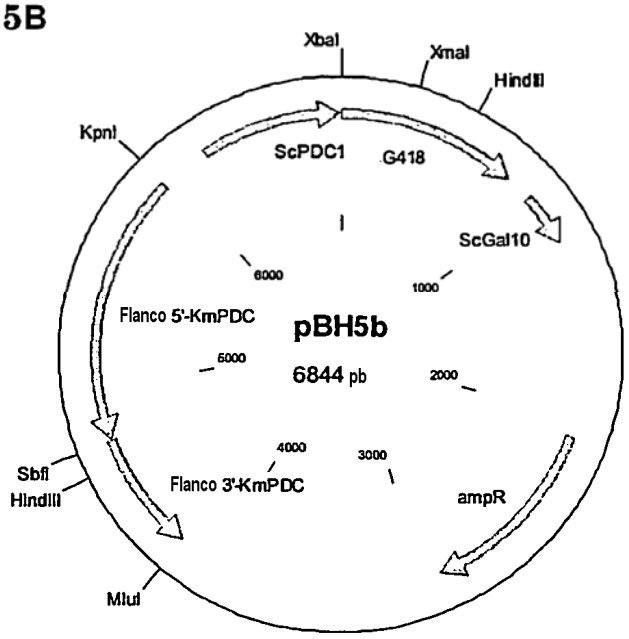

XbaI
XmaI
HindII
KpnI
ScPDC1
G418
ScGal10
6000
1000
Flanco 5'-KmPDC
pBH5b
5000
6844 pb
2000
4000
3000
SbfI
HindIII
Flanco 3'-KmPDC
ampR
MluI

Fig. 6A

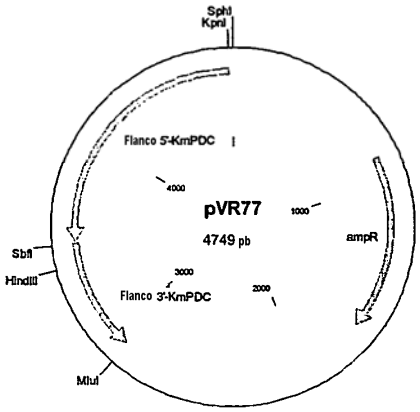


Fig. 6B

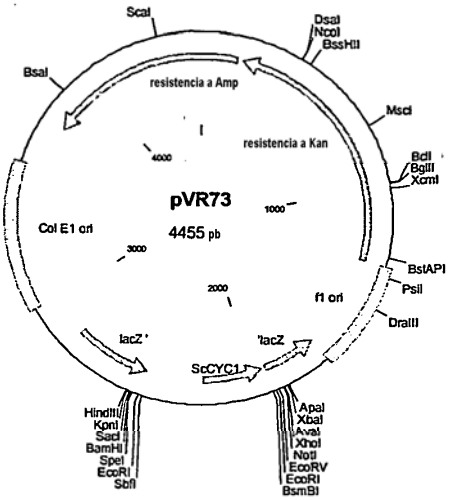


Fig. 6C

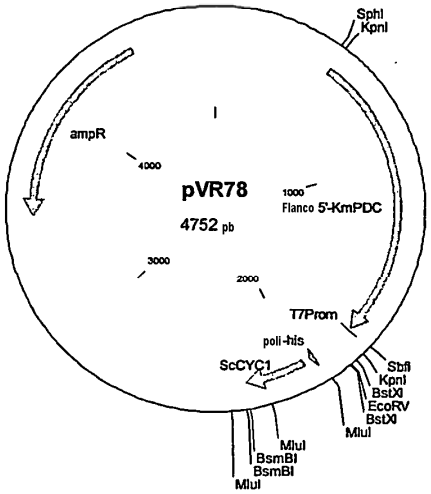


Fig. 7

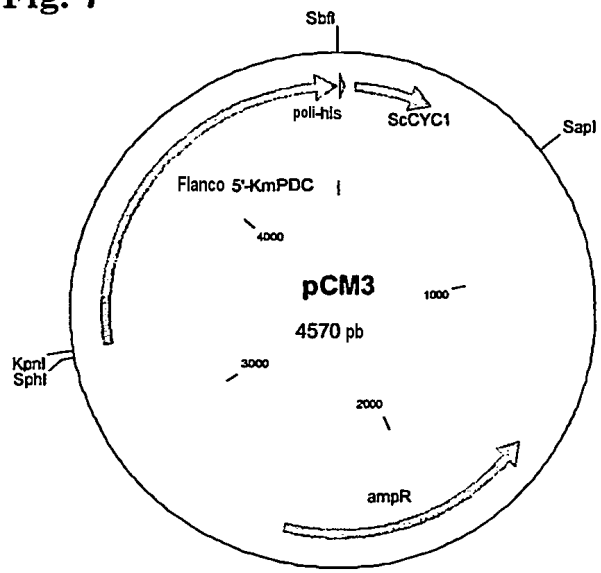

SbfI
poli-his
ScCYC1
SapI
Flanco 5'-KmPDC
4000
pCM3
1000
4570 pb
KpnI
SphI
3000
2000
ampR

Fig. 8

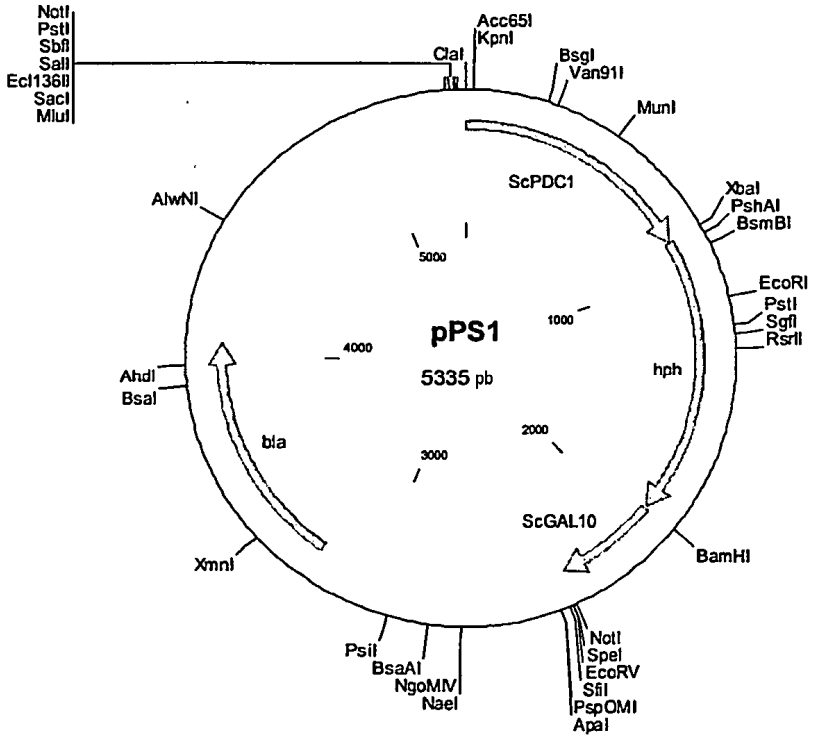

NotI
PstI
SbfI
SalI
Ecl136II
SacI
MluI
ClaI
Acc65I
KpnI
BsgI
Van91I
MunI
ScPDC1
XbaI
PshAI
BsmBI
AlwNI
5000
EcoRI
PstI
SgfI
RsrII
pPS1
1000
4000
5335 pb
hph
AhdI
BsaI
bla
2000
3000
ScGAL10
XmnI
BamHI
PsiI
BsaAI
NgoMIV
NaeI
NotI
SpeI
EcoRV
SfiI
PspOMI
ApaI

Fig. 9

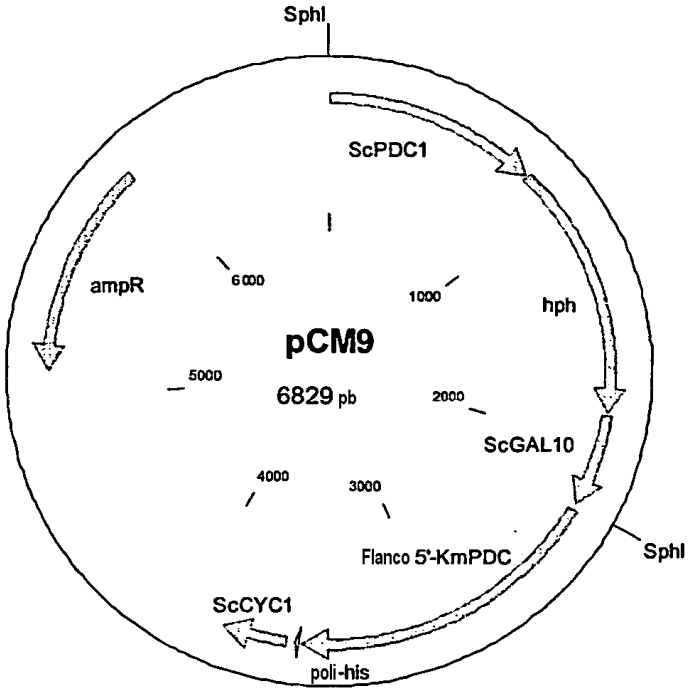

SphI
ScPDC1
ampR
6000
1000
hph
pCM9
5000
6829 pb
2000
ScGAL10
4000
3000
Flanco 5'-KmPDC
SphI
ScCYC1
poli-his

Fig. 10

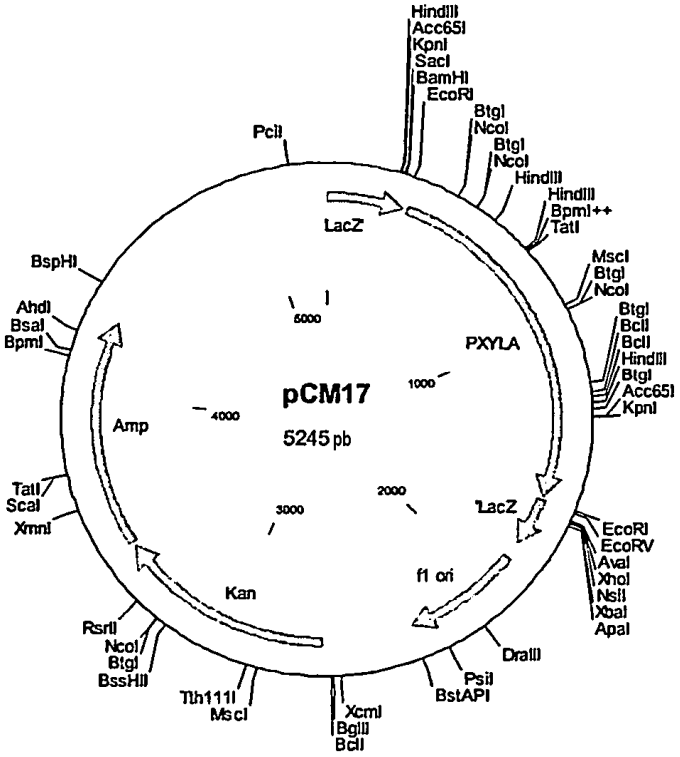

HindIII
Acc65I
KpnI
SacI
BamHI
EcoRI
BtgI
NcoI
BtgI
NcoI
HindIII
HindIII
BpmI++
TatI
PciI
LacZ
BspHI
MscI
BtgI
NcoI
AhdI
BsaI
BpmI
5000
BtgI
BclI
BclI
HindIII
BtgI
Acc65I
KpnI
PXYLA
1000
pCM17
4000
Amp
5245 pb
TatI
ScaI
XmnI
2000
3000
LacZ
EcoRI
EcoRV
AvaI
XhoI
NsiI
XbaI
ApaI
f1 ori
Kan
RsrII
NcoI
BtgI
BssHII
DraIII
PsiI
BstAPI
Tth111I
MscI
XcmI
BglII
BclI

Fig. 11

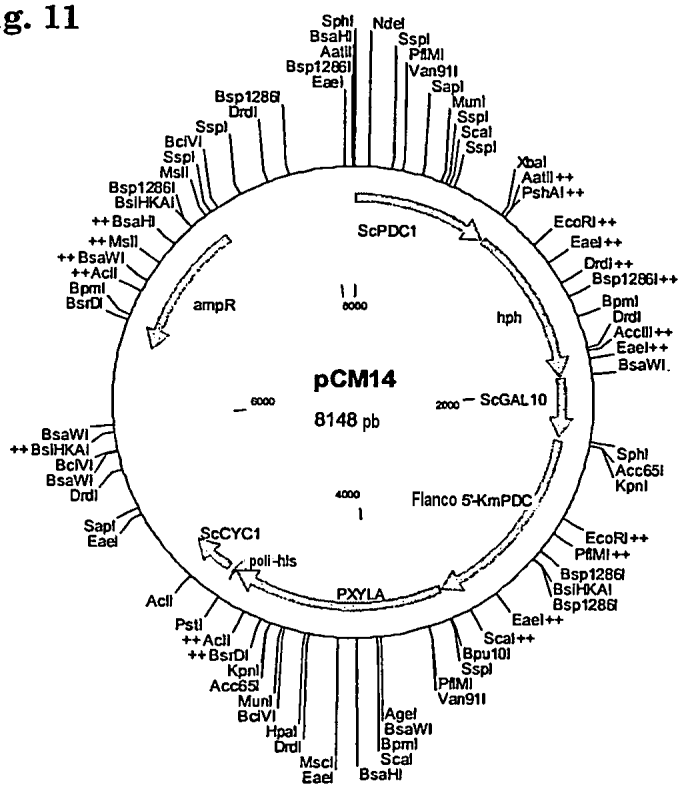

pCM14
8148 pb
ScPDC1
hph
ScGAL10
Flanco 5'-KmPDC
PXYLA
poli-his
ScCYC1
ampR
SphI
BsaHI
AatII
Bsp1286I
EaeI
NdeI
SspI
PflMI
Van91I
SapI
MunI
SspI
ScaI
SspI
XbaI
AatII++
PshAI++
EcoRI++
EaeI++
DrdI++
Bsp1286I++
BpmI
DrdI
AccIII++
EaeI++
BsaWI
SphI
Acc65I
KpnI
EcoRI++
PflMI++
Bsp1286I
BsiHKAI
Bsp1286I
EaeI++
ScaI++
Bpu10I
SspI
PflMI
Van91I
AgeI
BsaWI
BpmI
ScaI
BsaHI
MscI
EaeI
HpaI
DrdI
BclVI
MunI
Acc65I
KpnI
++BsrDI
++AclI
PstI
AclI
SapI
EaeI
DrdI
BsaWI
BclVI
++BsiHKAI
BsaWI
BsrDI
BpmI
++AclI
++BsaWI
++MslI
++BsaHI
BsiHKAI
Bsp1286I
MslI
SspI
BclVI
DrdI
Bsp1286I
SspI
2000
4000
6000
8000

Fig. 12

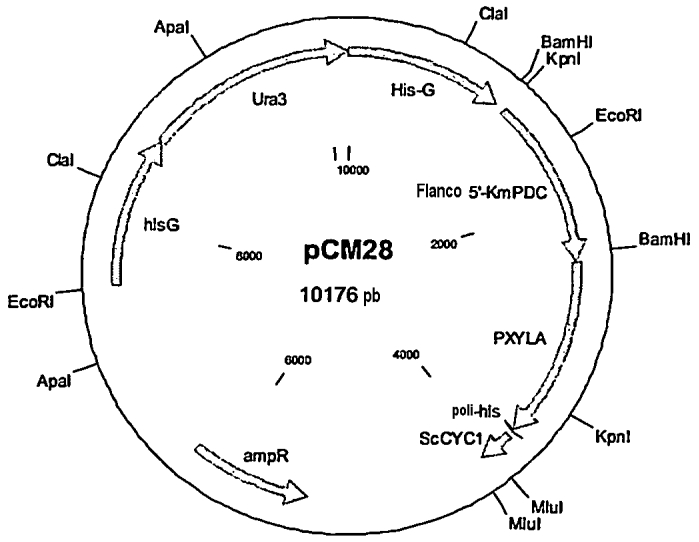

pCM28
10176 pb
Ura3
His-G
Flanco 5'-KmPDC
PXYLA
poli-his
ScCYC1
ampR
hisG
ApaI
ClaI
BamHI
KpnI
EcoRI
ClaI
BamHI
KpnI
MluI
MluI
EcoRI
ApaI
2000
4000
6000
8000
10000

Fig. 13

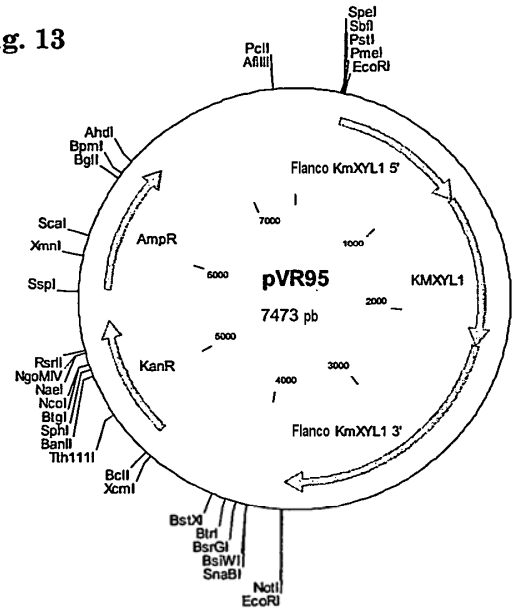


Fig. 14A

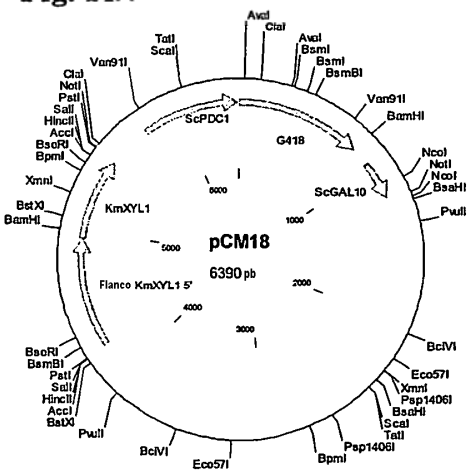


Fig. 14B

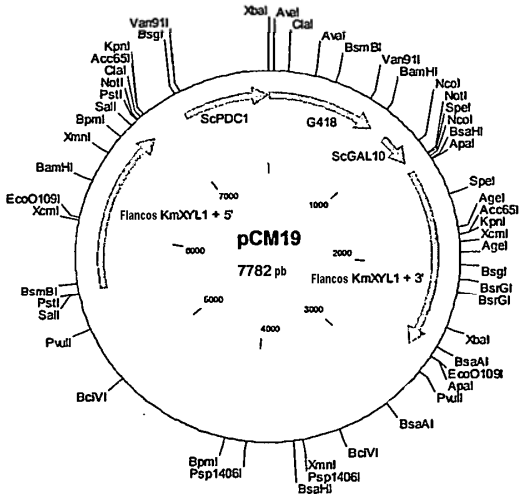


Fig. 15A

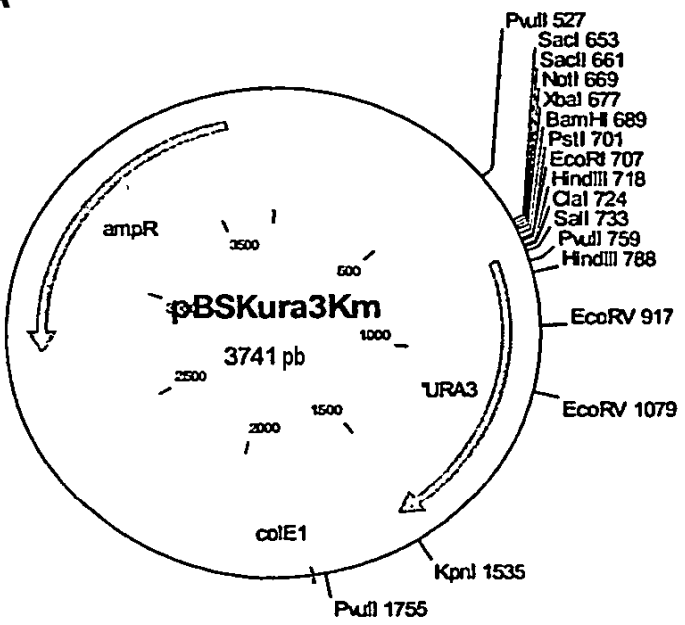


Fig. 15B

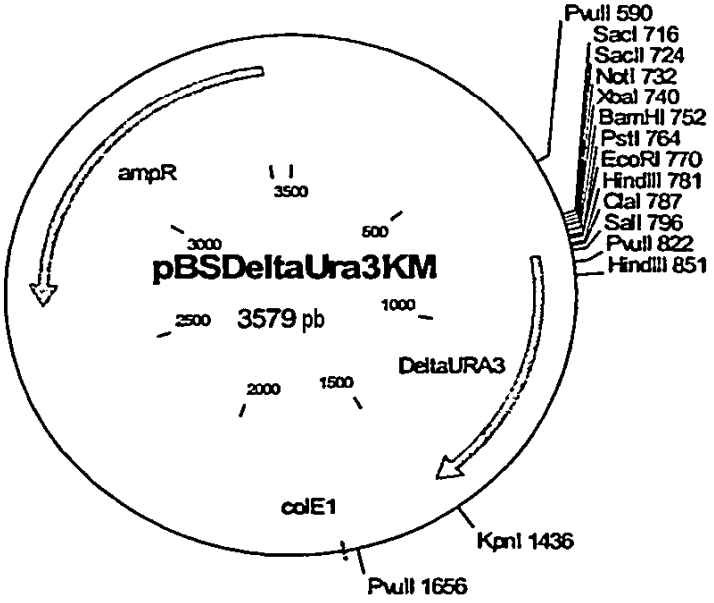


Fig. 16A

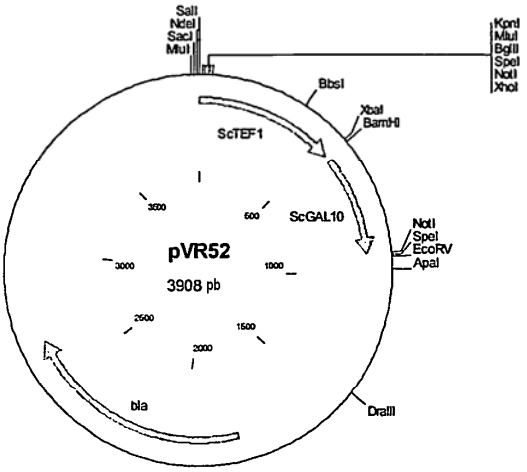


Fig. 16B

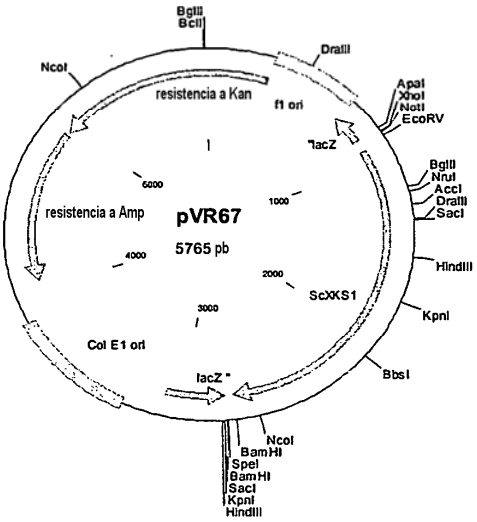


Fig. 16C

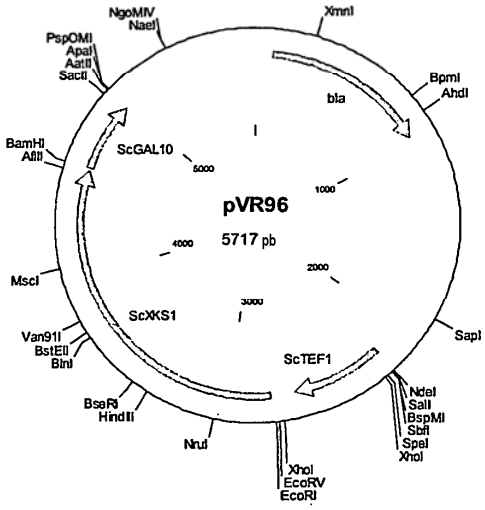


Fig. 17

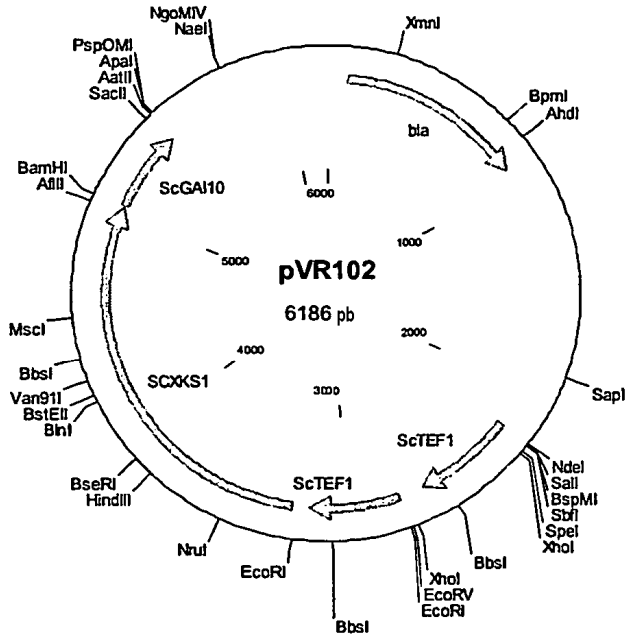

NgoMIV
NaeI
PspOMI
ApaI
AatII
SacII
XmnI
BpmI
AhdI
bla
BamHI
AflII
ScGAL10
6000
1000
5000
pVR102
6186 pb
MscI
2000
4000
BbsI
SCXKS1
3000
Van91I
BstEII
BlnI
SapI
ScTEF1
NdeI
SalI
BspMI
SbfI
SpeI
XhoI
BseRI
HindIII
ScTEF1
NruI
EcoRI
BbsI
XhoI
EcoRV
EcoRI
BbsI

Fig. 18

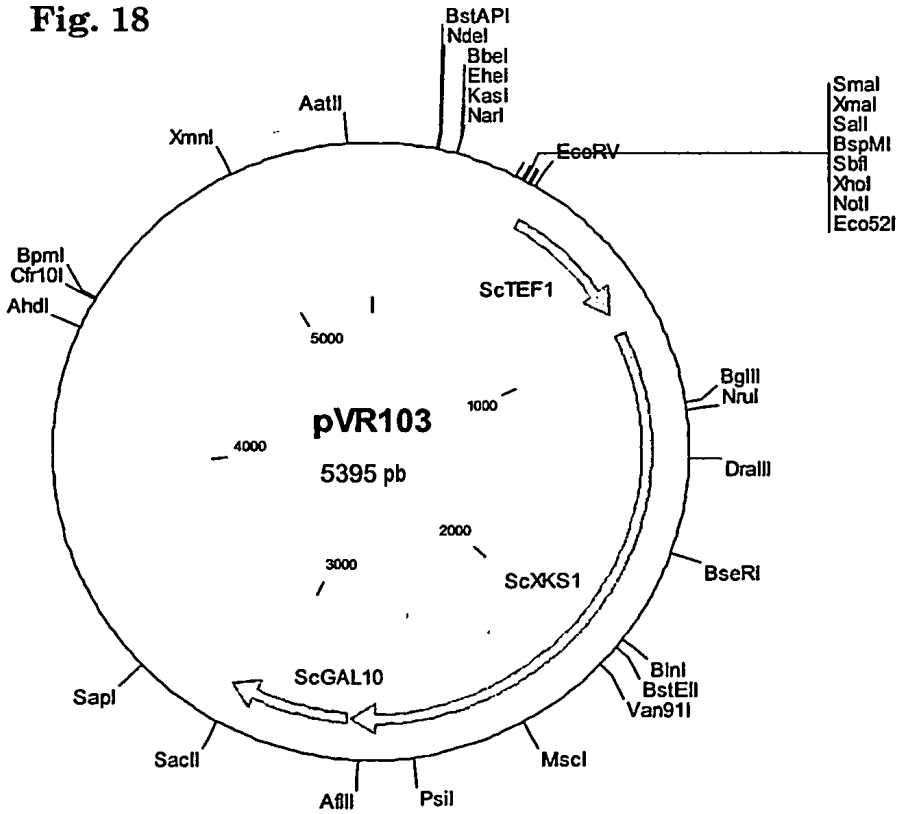

BstAPI
NdeI
BbeI
EheI
KasI
NarI
AatII
XmnI
EcoRV
SmaI
XmaI
SalI
BspMI
SbfI
XhoI
NotI
Eco52I
BpmI
Cfr10I
AhdI
ScTEF1
5000
1000
BglII
NruI
pVR103
4000
5395 pb
DraIII
2000
3000
ScXKS1
BseRI
BlnI
BstEII
Van91I
ScGAL10
SapI
SacII
MscI
AflII
PsiI

Fig. 19A

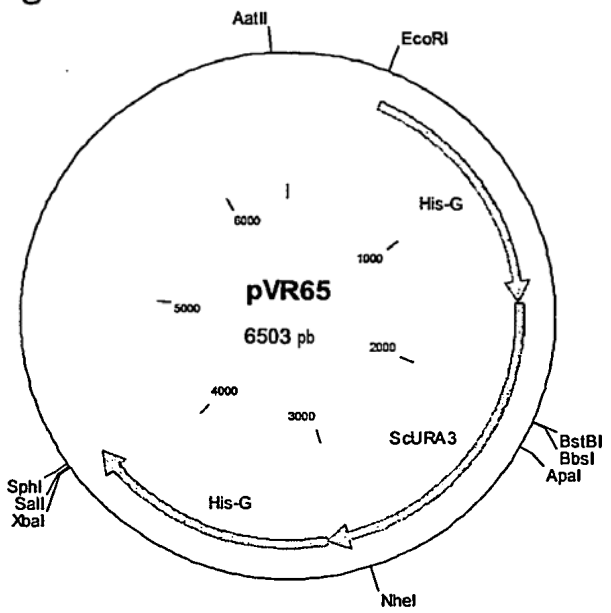


Fig. 19B

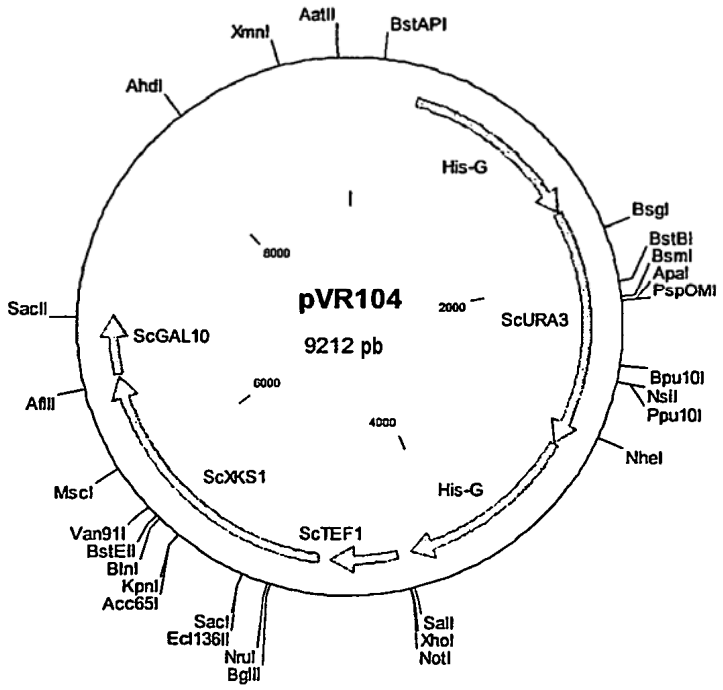


Fig. 20A

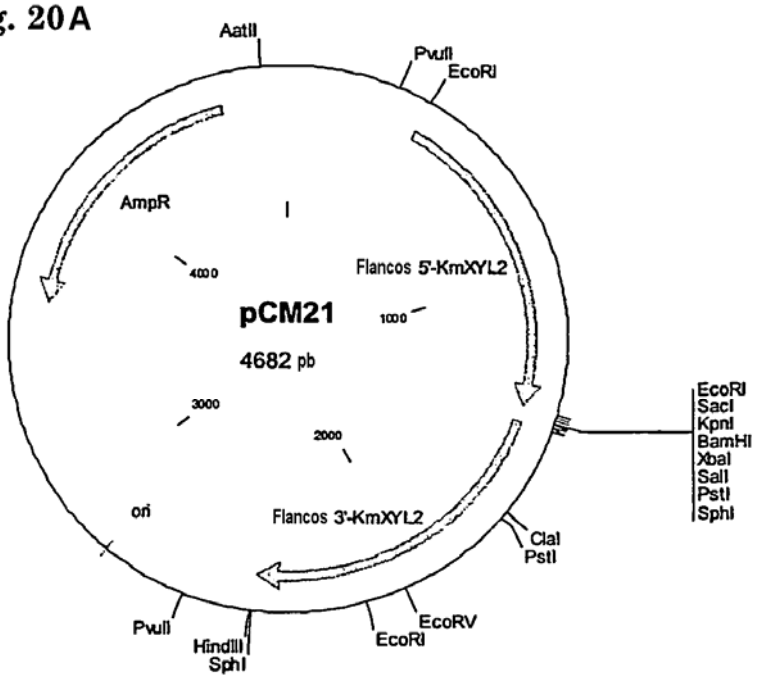


Fig. 20B

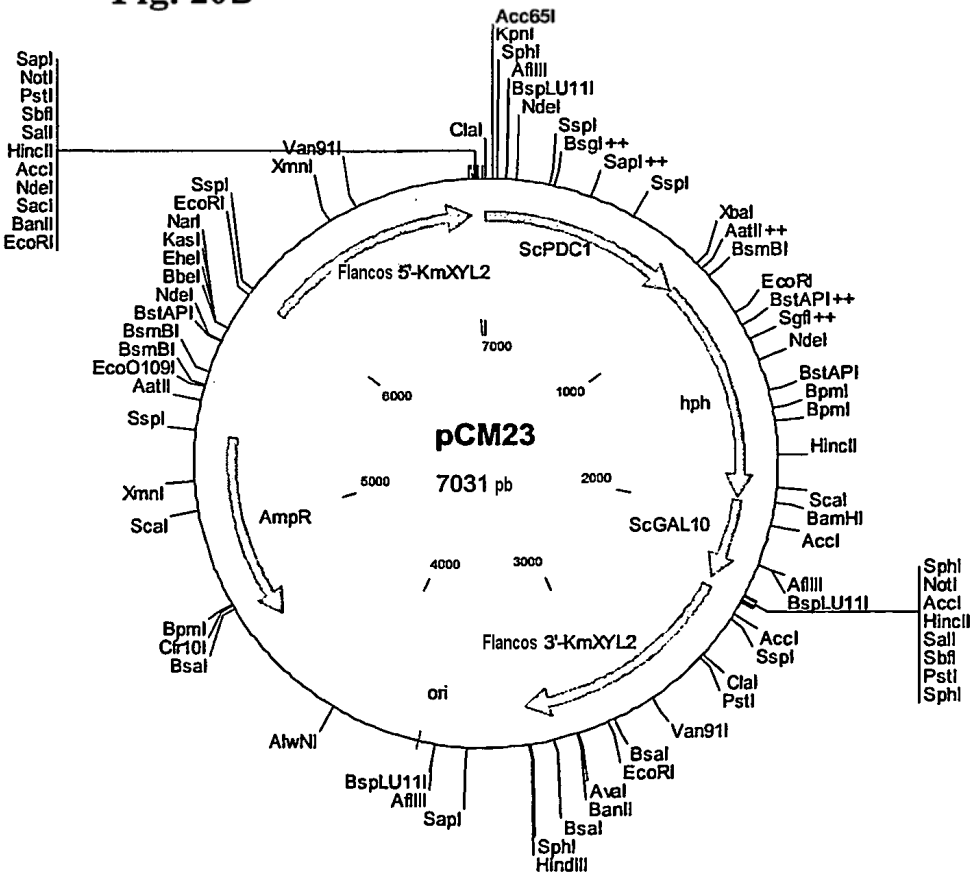


Fig. 21

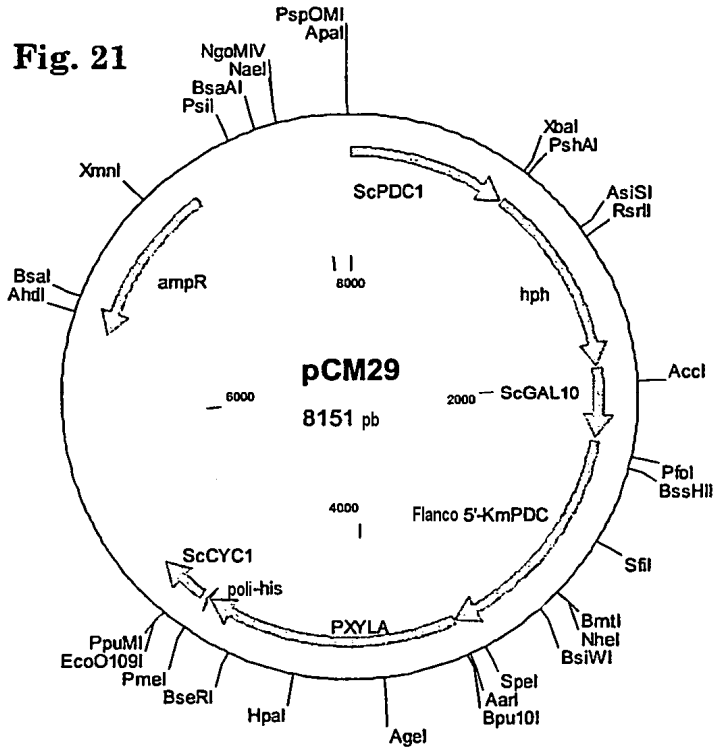

PspOMI
ApaI
NgoMIV
NaeI
BsaAI
PsiI
XbaI
PshAI
XmnI
ScPDC1
AsiSI
RsrII
BsaI
AhdI
ampR
8000
hph
pCM29
8151 pb
6000
2000
ScGAL10
AccI
PfoI
BssHII
4000
Flanco 5'-KmPDC
ScCYC1
SfiI
poli-his
PXYLA
BmtI
NheI
BsiWI
PpuMI
EcoO109I
PmeI
BseRI
HpaI
AgeI
SpeI
AarI
Bpu10I

Fig. 22

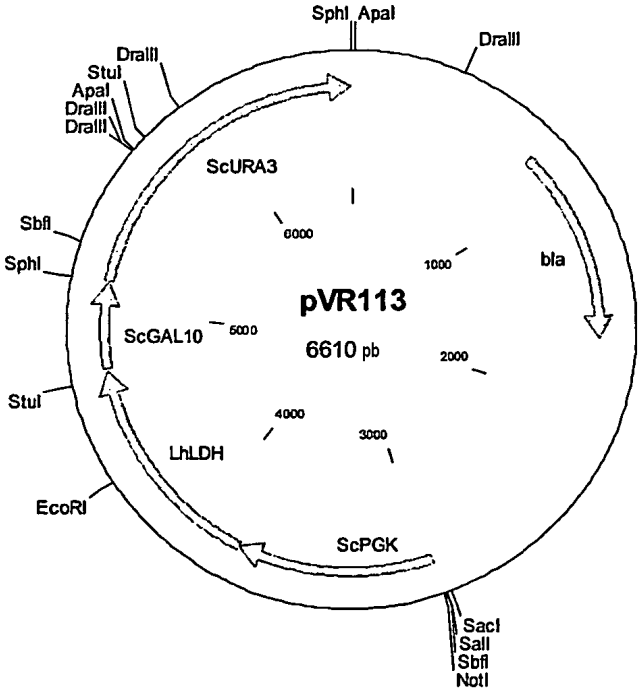

SphI
ApaI
DraIII
DraIII
StuI
ApaI
DraIII
DraIII
ScURA3
6000
SbfI
SphI
1000
bla
pVR113
ScGAL10
6000
6610 pb
2000
StuI
4000
3000
LhLDH
EcoRI
ScPGK
SacI
SalI
SbfI
NotI

Fig. 23

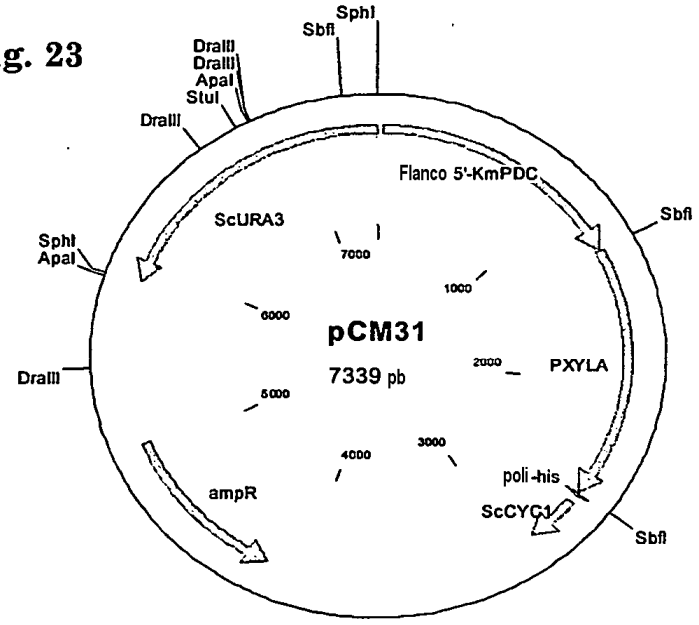

SphI
SbfI
DraIII
DraIII
ApaI
StuI
DraIII
Flanco 5'-KmPDC
SbfI
ScURA3
SphI
ApaI
7000
1000
6000
pCM31
7339 pb
2000
PXYLA
DraIII
5000
3000
4000
poli-his
ampR
ScCYC1
SbfI

Fig. 24

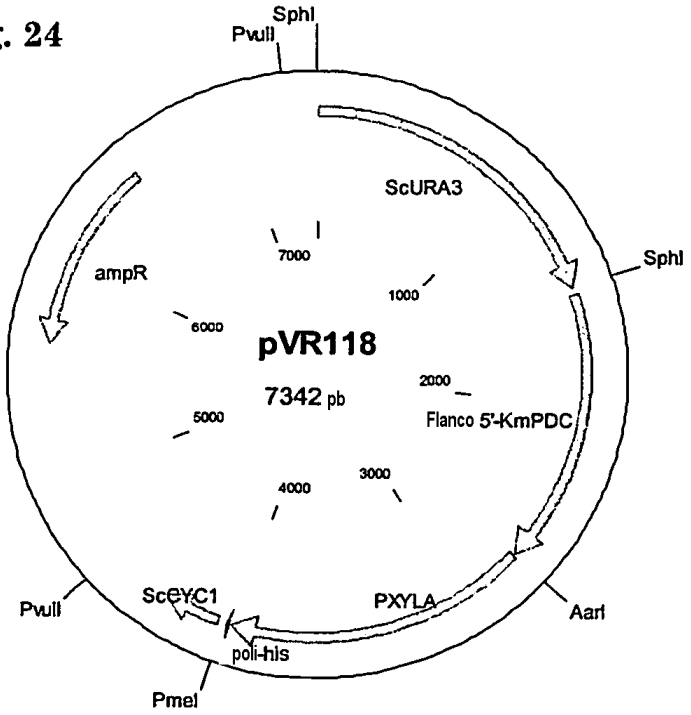

SphI
PvuII
ScURA3
7000
SphI
ampR
1000
6000
pVR118
2000
7342 pb
5000
Flanco 5'-KmPDC
3000
4000
PvuII
ScCYC1
PXYLA
AarI
poli-his
PmeI

Fig. 25

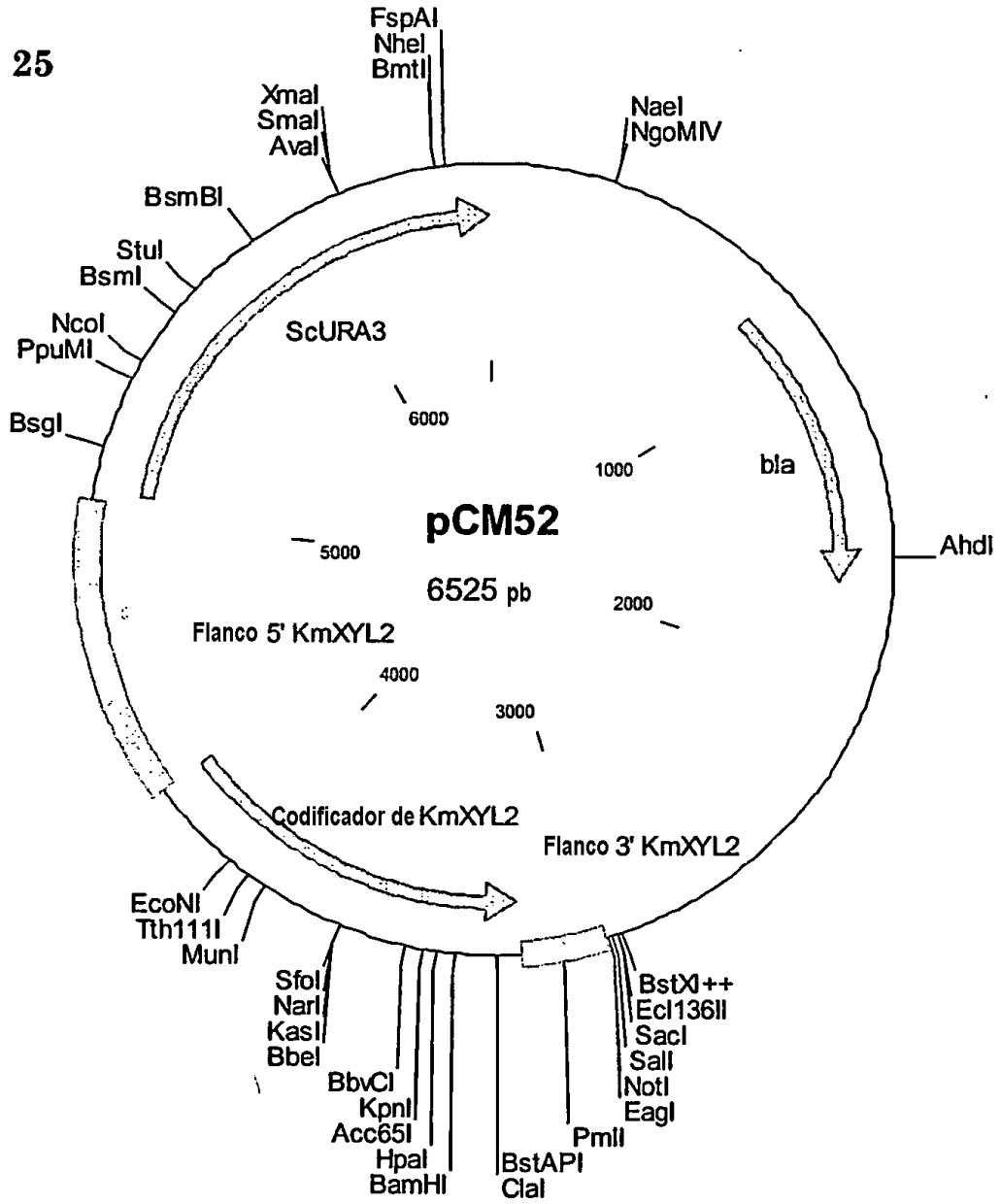

FspAI
NheI
BmtI
XmaI
SmaI
AvaI
NaeI
NgoMIV
BsmBI
StuI
BsmI
NcoI
PpuMI
BsgI
ScURA3
6000
1000
bla
pCM52
5000
6525 pb
2000
AhdI
Flanco 5' KmXYL2
4000
3000
Codificador de KmXYL2
Flanco 3' KmXYL2
EcoNI
Tth111I
MunI
SfoI
NarI
KasI
BbeI
BbvCI
KpnI
Acc65I
HpaI
BamHI
BstAPI
ClaI
PmlI
BstXI++
Ecl136II
SacI
SalI
NotI
EagI

Fig. 26

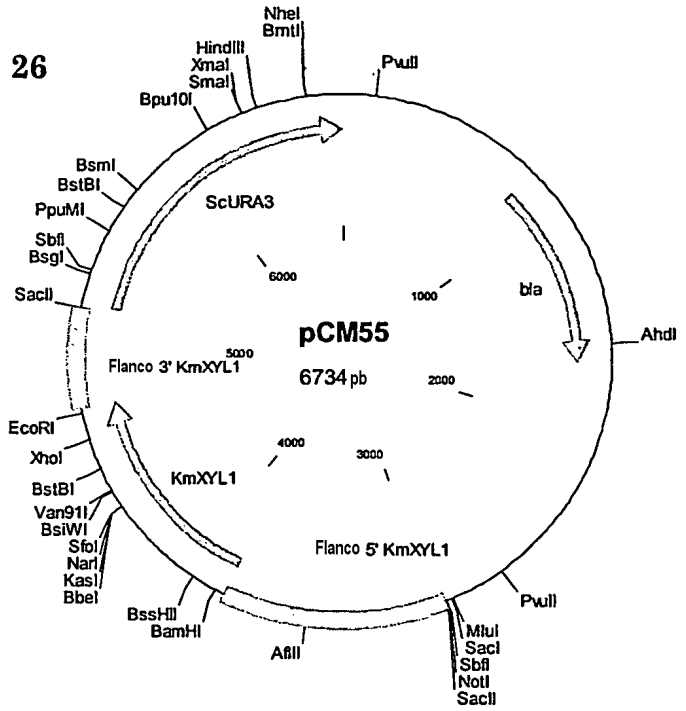

NheI
BmtI
HindIII
XmaI
SmaI
PvuII
Bpu10I
BsmI
BstBI
PpuMI
SbfI
BsgI
SacII
ScURA3
6000
1000
bla
AhdI
pCM55
6734 pb
5000
Flanco 3' KmXYL1
2000
EcoRI
XhoI
BstBI
Van91I
BsiWI
SfoI
NarI
KasI
BbeI
4000
3000
KmXYL1
Flanco 5' KmXYL1
PvuII
BssHII
BamHI
AflII
MluI
SacI
SbfI
NotI
SacII

Fig. 27

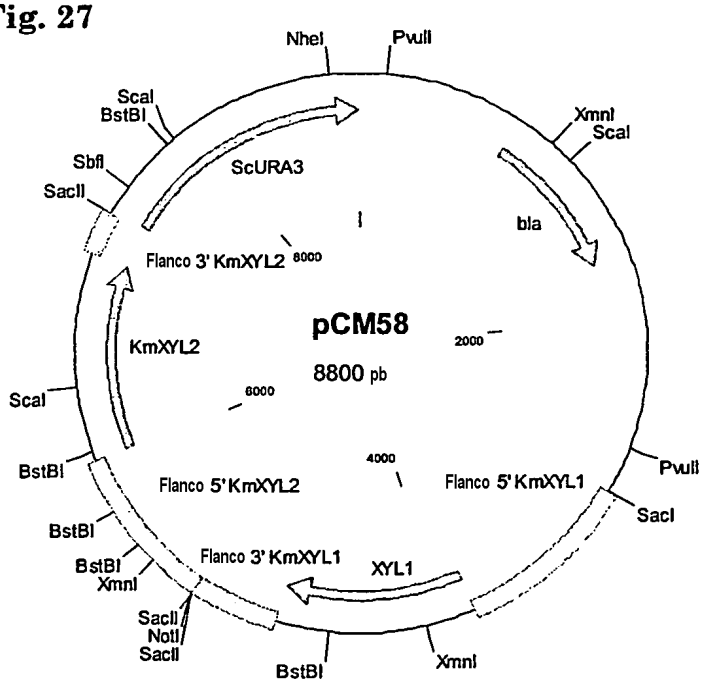

NheI
PvuII
ScaI
BstBI
XmnI
ScaI
SbfI
SacII
ScURA3
bla
Flanco 3' KmXYL2
8000
pCM58
8800 pb
2000
KmXYL2
6000
ScaI
BstBI
4000
PvuII
Flanco 5' KmXYL2
Flanco 5' KmXYL1
SacI
BstBI
BstBI
XmnI
Flanco 3' KmXYL1
XYL1
SacII
NotI
SacII
BstBI
XmnI

Fig. 28

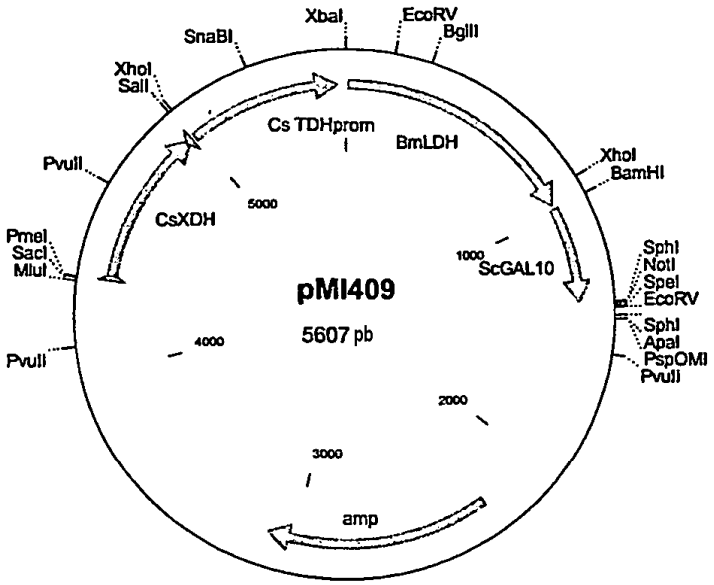

XbaI
EcoRV
BglII
SnaBI
XhoI
SalI
Cs TDHprom
BmLDH
XhoI
BamHI
PvuII
5000
CsXDH
PmeI
SacI
MluI
1000
ScGAL10
SphI
NotI
SpeI
EcoRV
pMI409
5607 pb
SphI
ApaI
PspOMI
PvuII
4000
PvuII
2000
3000
amp

Fig. 29

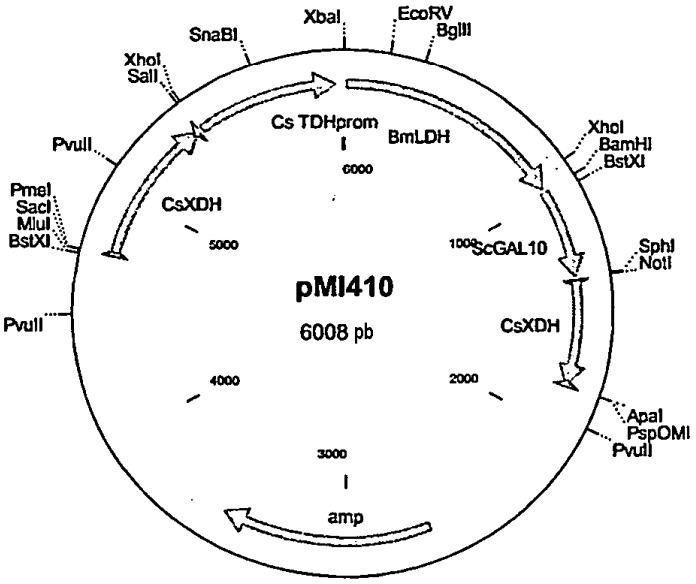

XbaI
EcoRV
BglII
SnaBI
XhoI
SalI
Cs TDHprom
BmLDH
XhoI
BamHI
BstXI
PvuII
6000
PmeI
SacI
MluI
BstXI
CsXDH
5000
1000
ScGAL10
SphI
NotI
pMI410
6008 pb
PvuII
CsXDH
4000
2000
ApaI
PspOMI
PvuII
3000
amp

Fig.30

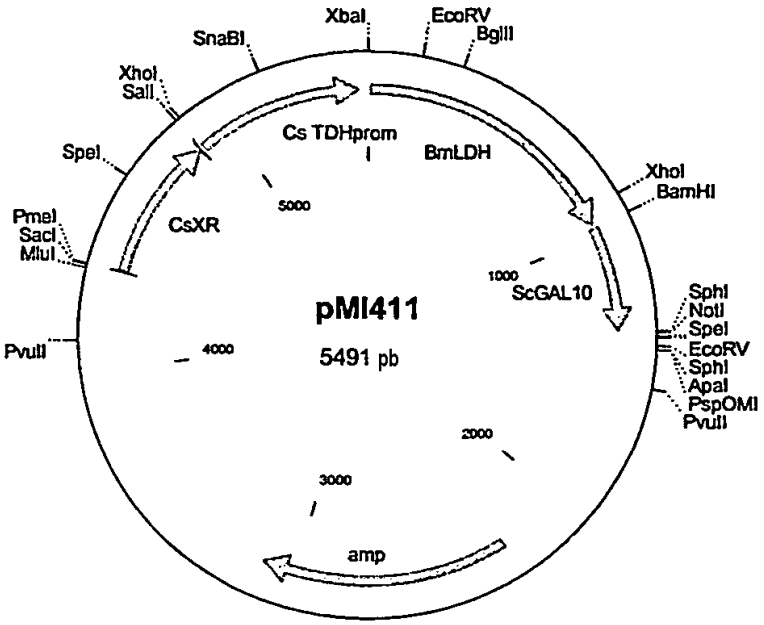

XbaI
EcoRV
BglII
SnaBI
XhoI
SalI
SpeI
Cs TDHprom
BmLDH
XhoI
BamHI
PmeI
SacI
MluI
CsXR
5000
1000
ScGAL10
pMI411
5491 pb
SphI
NotI
SpeI
EcoRV
SphI
ApaI
PspOMI
PvuII
PvuII
4000
2000
3000
amp

Fig. 31

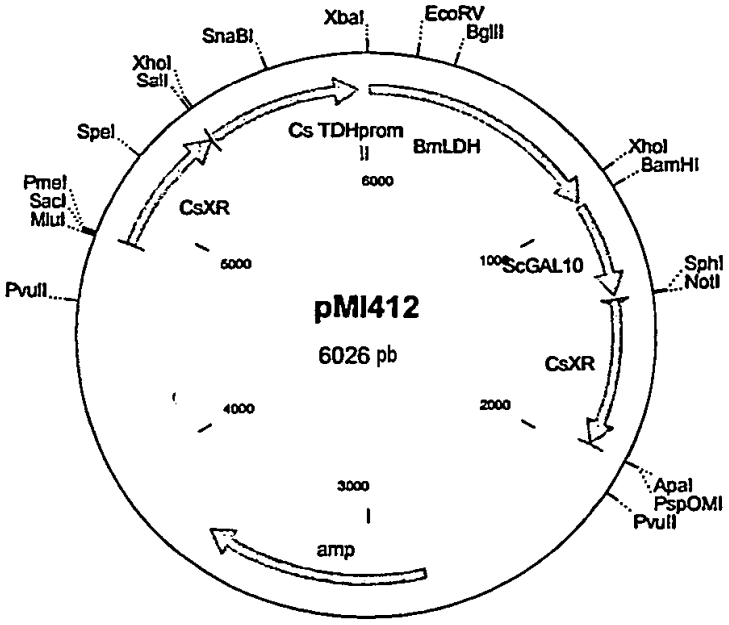

XbaI
EcoRV
BglII
SnaBI
XhoI
SalI
SpeI
Cs TDHprom
BmLDH
XhoI
BamHI
6000
PmeI
SacI
MluI
CsXR
5000
100
ScGAL10
SphI
NotI
PvuII
pMI412
6026 pb
CsXR
4000
2000
3000
ApaI
PspOMI
PvuII
amp

Fig. 32

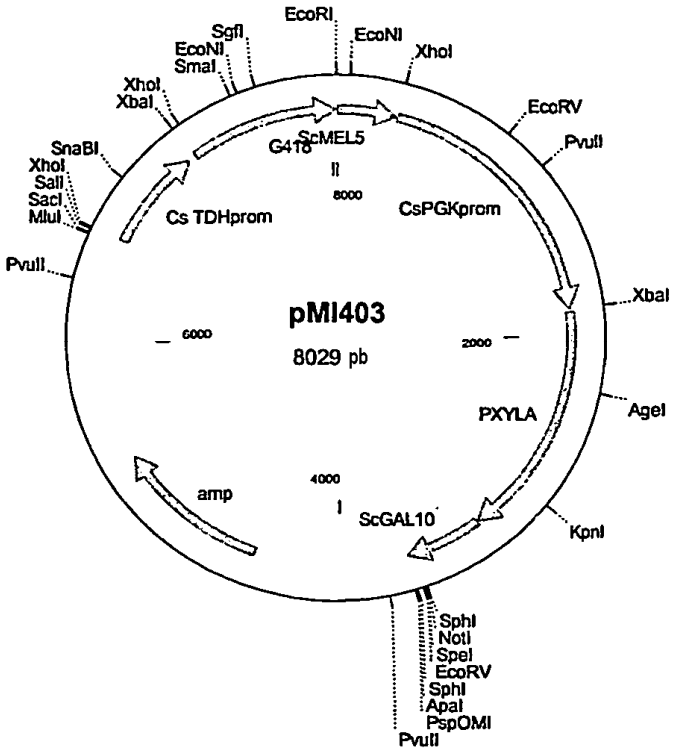

EcoRI
EcoNI
XhoI
EcoRV
PvuII
XbaI
AgeI
KpnI
SphI
NotI
SpeI
EcoRV
SphI
ApaI
PspOMI
PvuII
SgfI
EcoNI
SmaI
XhoI
XbaI
SnaBI
XhoI
SalI
SacI
MluI
PvuII
G418
ScMEL5
8000
CsPGKprom
Cs TDHprom
pMI403
8029 pb
6000
2000
PXYLA
amp
4000
ScGAL10

Fig. 33

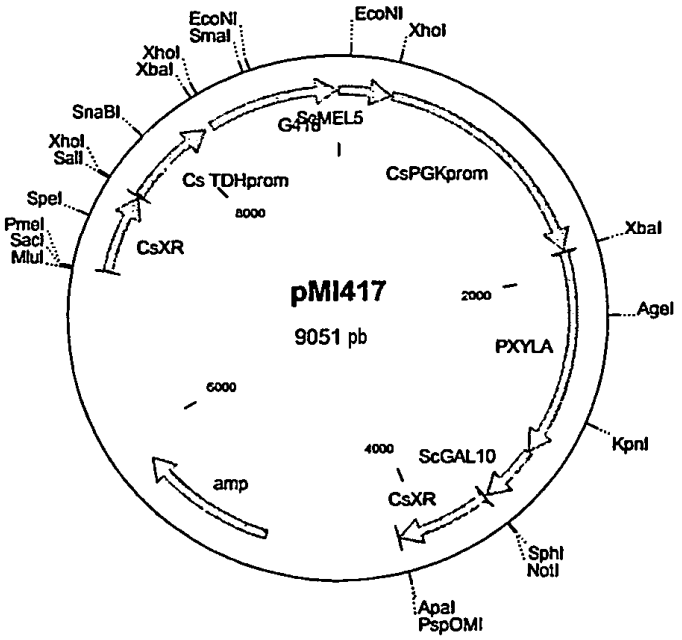

EcoNI
XhoI
EcoNI
SmaI
XhoI
XbaI
SnaBI
XhoI
SalI
SpeI
PmeI
SacI
MluI
G418
ScMEL5
CsPGKprom
Cs TDHprom
8000
CsXR
XbaI
AgeI
pMI417
9051 pb
2000
PXYLA
6000
KpnI
4000
ScGAL10
amp
CsXR
SphI
NotI
ApaI
PspOMI

Fig. 34

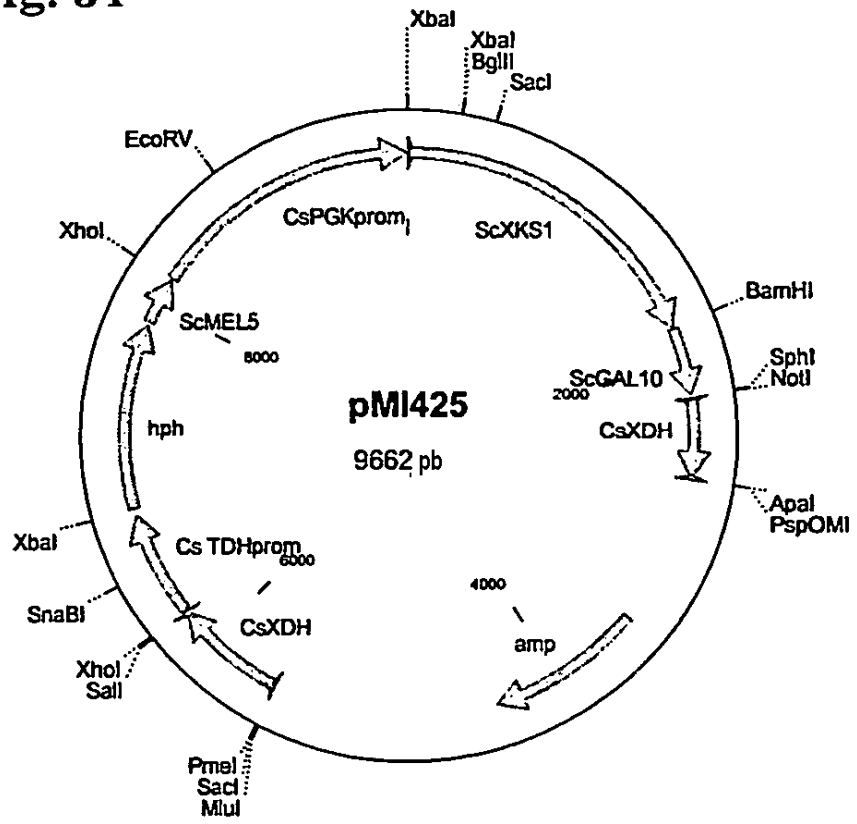

XbaI
XbaI
BglII
SacI
EcoRV
XhoI
CsPGKprom
ScXKS1
BamHI
ScMEL5
8000
SphI
NotI
ScGAL10
2000
pMI425
9662 pb
hph
CsXDH
ApaI
PspOMI
XbaI
Cs TDHprom
6000
4000
SnaBI
CsXDH
amp
XhoI
SalI
PmeI
SacI
MluI

Fig. 35

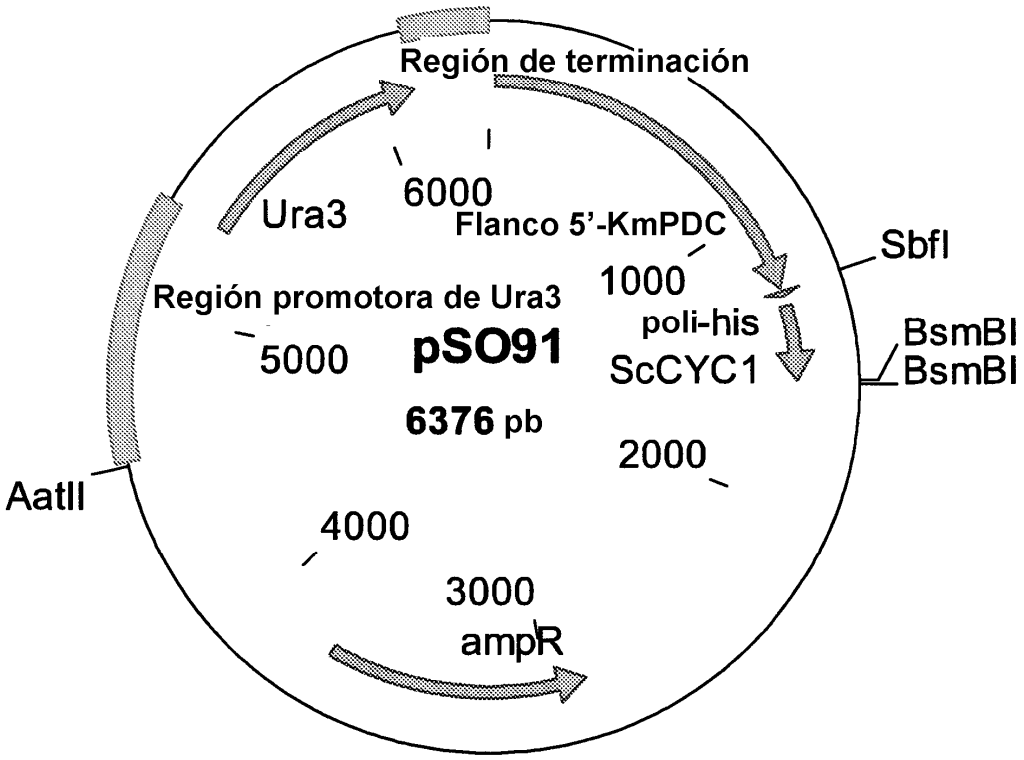

Región de terminación
6000
Ura3
Flanco 5'-KmPDC
SbfI
1000
Región promotora de Ura3
poli-his
BsmBI
5000
pSO91
ScCYC1
BsmBI
6376 pb
2000
AatII
4000
3000
ampR

Fig. 36

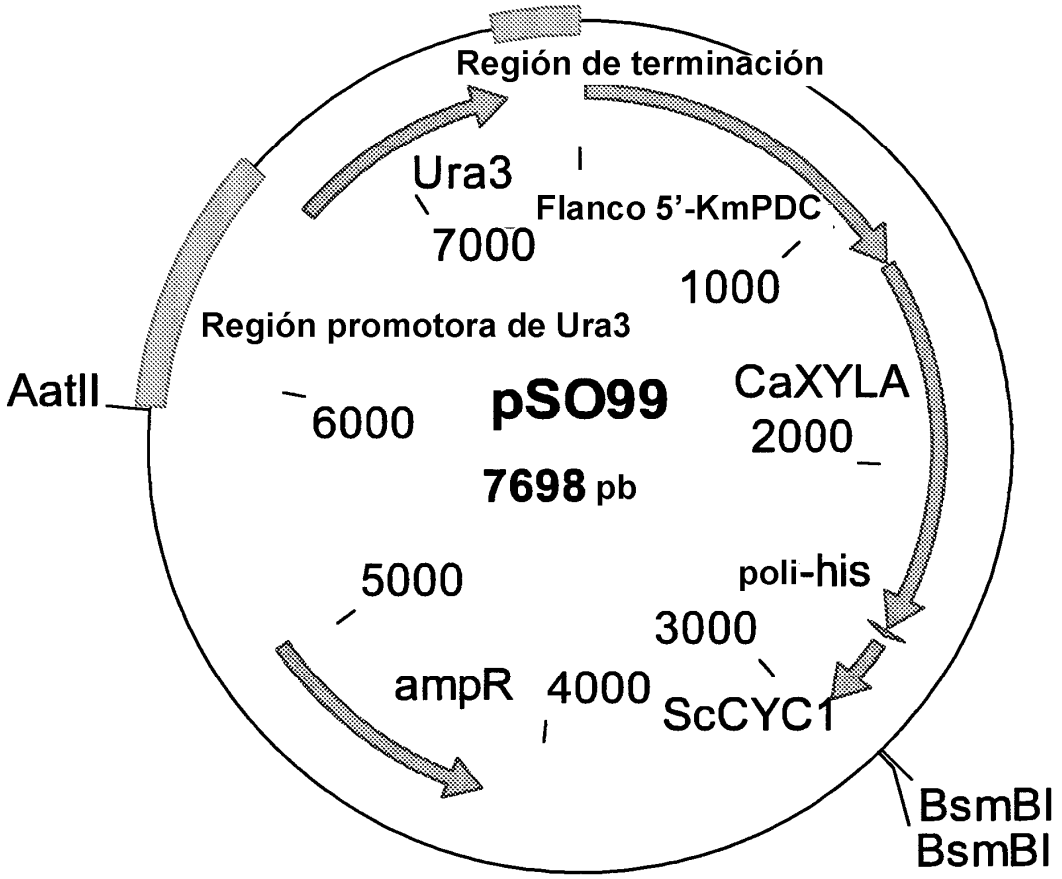

Región de terminación
Ura3
Flanco 5'-KmPDC
7000
1000
Región promotora de Ura3
AatII
6000
pSO99
CaXYLA
2000
7698 pb
5000
poli-his
3000
ampR
4000
ScCYC1
BsmBI
BsmBI

Fig. 37

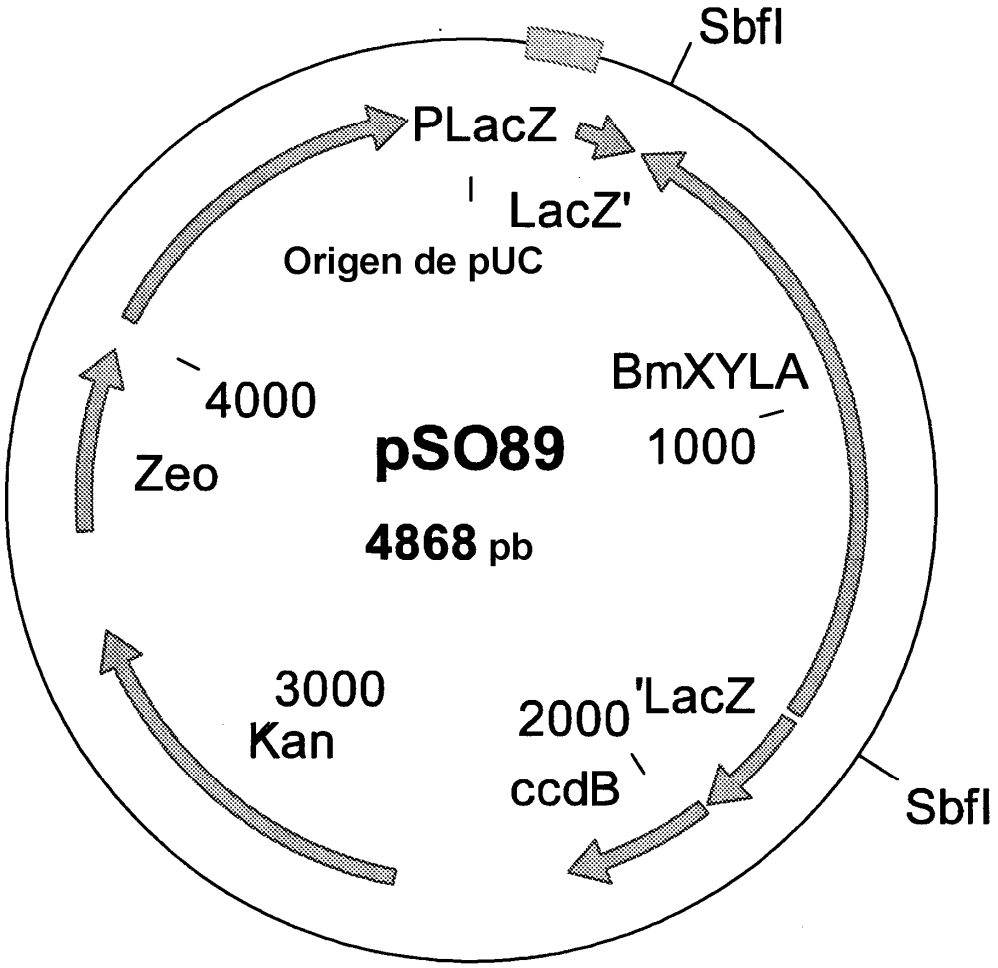

SbfI
PLacZ
LacZ'
Origen de pUC
BmXYLA
4000
1000
Zeo
pSO89
4868 pb
3000
Kan
2000
'LacZ
ccdB
SbfI

Fig. 38

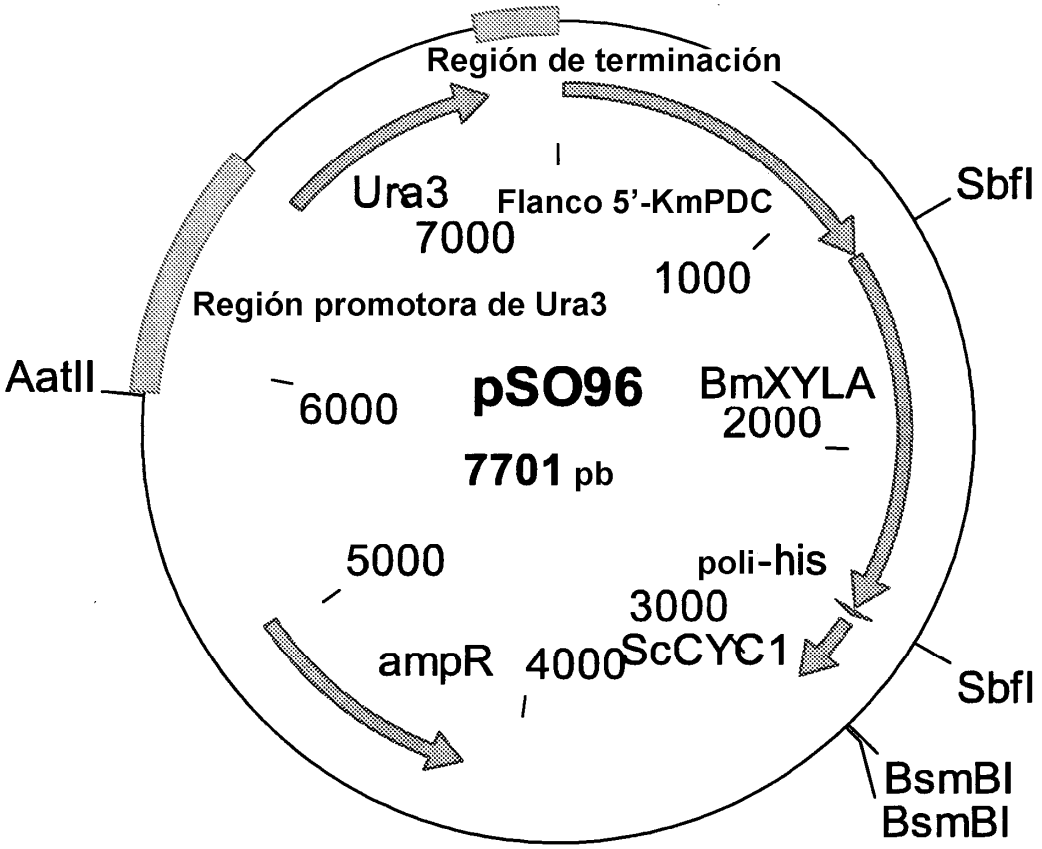

Región de terminación
Ura3
Flanco 5'-KmPDC
7000
1000
Región promotora de Ura3
SbfI
AatII
6000
pSO96
BmXYLA
2000
7701 pb
5000
poli-his
3000
ampR
4000
ScCYC1
SbfI
BsmBI
BsmBI

Fig. 39

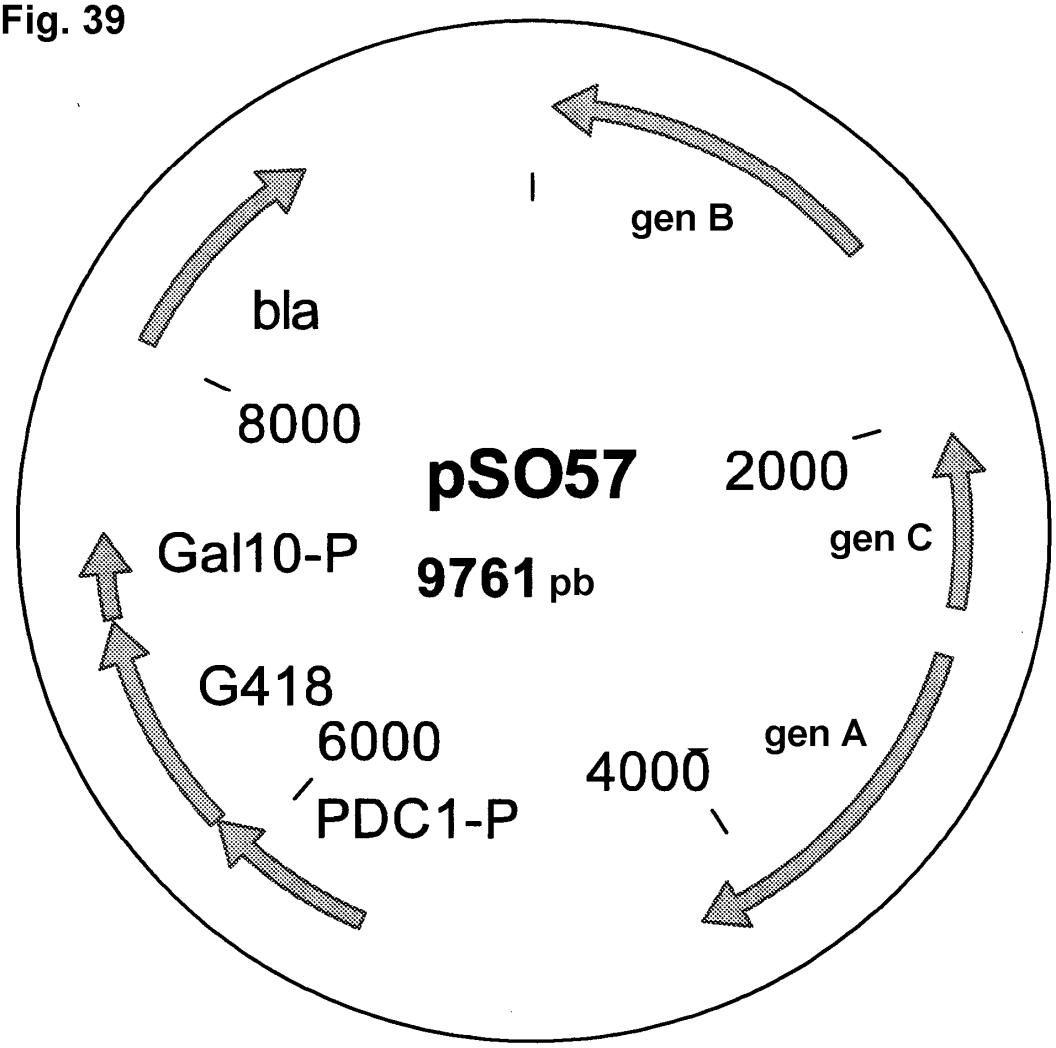
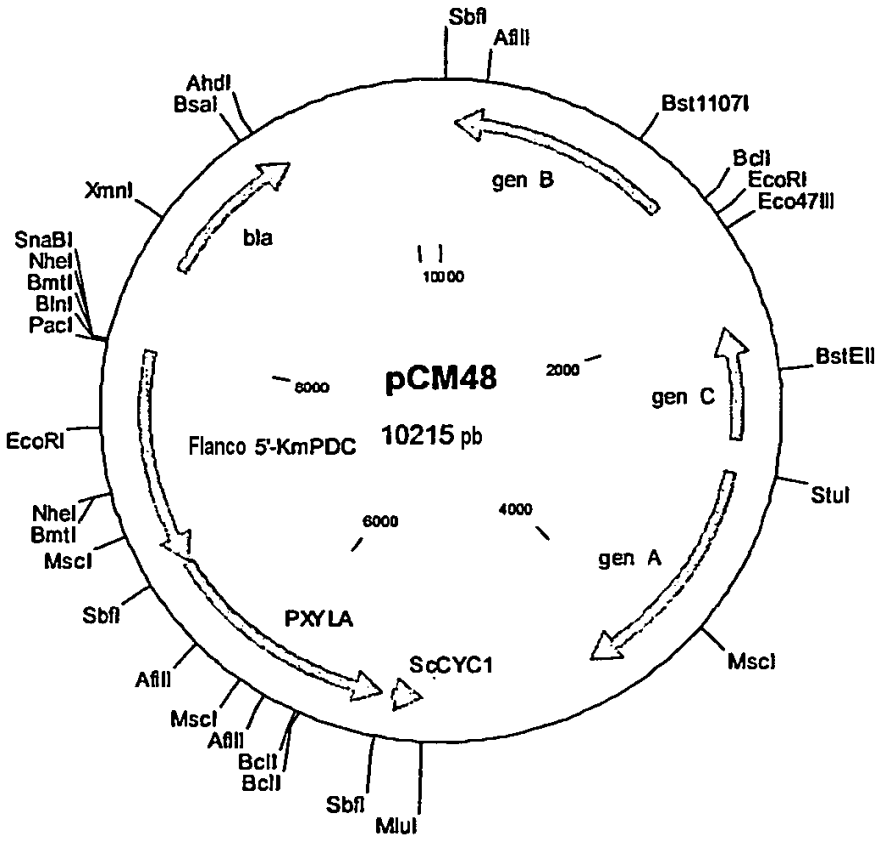

gen B
bla
8000
pSO57
2000
gen C
Gal10-P
9761 pb
G418
6000
gen A
4000
PDC1-P

Fig. 40


Sbfl
AflII
Bst1107I
BclI
EcoRI
Eco47III
BstEII
StuI
MscI
MluI
Sbfl
BclI
BclI
AflII
MscI
AflII
Sbfl
EcoRI
MscI
BmtI
NheI
SnaBI
PacI
BlnI
BmtI
NheI
XmnI
AhdI
BsaI
bla
gen B
gen C
gen A
PXYLA
ScCYC1
Flanco 5'-KmPDC
pCM48
10215 pb
10000
2000
4000
6000
6000