

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 638**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12N 9/92 (2006.01)

C12P 19/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2009 E 09772164 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2313495**

54 Título: **Xilosa-isomerasa procariótica para la construcción de levaduras fermentadoras de xilosa**

30 Prioridad:

02.07.2008 DE 102008031350

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

15.03.2016

73 Titular/es:

**LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)
41, rue Etienne Marcel
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BRAT, DAWID;
BOLES, ECKHARD;
KELLER, MARCO y
ROTHER, BEATE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 563 638 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

Xilosa-isomerasa procariótica para la construcción de levaduras fermentadoras de xilosa

La presente invención se refiere al uso de moléculas de ácidos nucleicos que codifican una xilosa-isomerasa (XI) bacteriana que procede preferiblemente de *Clostridium phytofermentans*, para la reacción/metabolización, en este caso, en particular, fermentación, con microorganismos recombinantes de biomaterial con contenido en xilosa y, en particular, a la producción de bioalcoholes, en este caso en particular bioetanol, mediante levaduras fermentadoras de xilosa. La presente invención se refiere, además, a células, en particular, células eucarióticas que están transformadas con una construcción de expresión de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI), confiriendo la expresión de la construcción de expresión de ácidos nucleicos a las células la capacidad de isomerizar xilosa directamente en xilulosa. Estas células se utilizan preferiblemente para la reacción/metabolización, en este caso, en particular, fermentación, de biomaterial con contenido en xilosa y, en particular, para la producción de bioalcoholes, en este caso, en particular, bioetanol. La presente invención se refiere, además, a procedimientos para la producción de bioetanol y a procedimientos para la producción de otros productos del metabolismo, que comprenden el metabolismo de medios que contienen xilosa.

15 **Antecedentes de la invención**

La levadura de la cerveza, del vino y del panadero *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza ya desde hace siglos para la fabricación de pan, vino y cerveza en virtud de su propiedad de fermentar el azúcar en etanol y dióxido de carbono. En biotecnología, *S. cerevisiae* encuentra aplicación, junto a la producción de proteínas heterólogas, ante todo en la producción de etanol para fines industriales. El etanol se utiliza en numerosas ramas de la industria como sustrato de partida para síntesis. Debido a los yacimientos petrolíferos cada vez más escasos, los precios crecientes del petróleo y la demanda mundial de gasolina constantemente creciente, el etanol adquiere cada vez más importancia como alternativa de combustible.

Con el fin de hacer posible una producción de bioetanol rentable y eficiente se ofrece el uso de biomasa con contenido en lignocelulosa tal como, p. ej., paja, residuos de la industria de la madera y agrícola y la porción orgánica de la basura doméstica diaria, como sustrato de partida. Éste es, por una parte, muy económico y, por otra, está presente en gran cantidad. Los tres mayores componentes de la lignocelulosa son lignina, celulosa y hemicelulosa. La hemicelulosa, polímero que, después de la celulosa, se presenta con mayor frecuencia en segundo lugar, es un heteropolímero fuertemente ramificado. Se compone de pentosas (L-arabinosa, D-xilosa), ácidos urónicos (ácido 4-O-metil-D-glucurónico, ácido D-galacturónico) y hexosas (D-manosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-glucosa) (véase la Figura 1). La hemicelulosa se puede hidrolizar ciertamente de manera más sencilla que la celulosa, pero posee las pentosas L-arabinosa y D-xilosa que no pueden ser normalmente transformadas por la levadura *S. cerevisiae*.

Con el fin de poder aprovechar las pentosas para las fermentaciones, éstas deben acceder primeramente a la célula a través de la membrana plasmática. A pesar de que *S. cerevisiae* no está en condiciones de metabolizar D-xilosa, puede absorber a ésta en la célula. Sin embargo, *S. cerevisiae* no posee transportador específico alguno. El transporte tiene lugar con ayuda de los numerosos transportadores de hexosa. La afinidad de los transportadores por D-xilosa es, sin embargo, claramente menor que por la D-glucosa (Kotter y Ciriacy, 1993). En levaduras que pueden metabolizar D-xilosa tales como, p. ej., *P. stipitis*, *C. shehatae* o *P. tannophilus* (Du Preez et al., 1986) existen tanto transportadores poco afines inespecíficos que transportan D-glucosa como simportadores de protones muy afines específicos sólo para D-xilosa (Hahn-Hagerdal et al., 2001).

Procesamiento de D-xilosa

Diferentes bacterias, levaduras y hongos están en condiciones de metabolizar xilosa. La metabolización de xilosa se diferencia en el caso de procariotas y eucariotas principalmente en el tipo de isomerización de la xilosa para dar xilulosa. En procariotas, la conversión de xilosa en xilulosa tiene lugar mediante la enzima xilosa-isomerasa (XI). En eucariotas, la xilosa es isomerizada la mayoría de las veces en dos etapas. Primeramente, xilosa es reducida en xilitol mediante la xilosa-reductasa (XR) dependiente de NAD(P)H y es convertida en xilulosa mediante la xilitol-deshidrogenasa (XDH) dependiente de NAD. La subsiguiente reacción de fosforilación tiene lugar en procariotas y eucariotas mediante la xiluloquinasa (XK).

El compuesto intermedio xilulosa-5-fosfato resultante es un compuesto intermedio de la vía de la pentosa-fosfato. La parte principal del xilulosa-5-fosfato accede en forma de fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato en la glucólisis y allí es hecho reaccionar adicionalmente para formar piruvato (Schaaff-Gerstenschläger y Miosga, 1997). Bajo condiciones fermentativas, el azúcar se continúa degradando en etanol mediante la piruvato Descarboxilasa y mediante la alcohol-deshidrogenasa. Bajo condiciones aerobias, el piruvato puede ser oxidado en el ciclo del citrato a través de una serie de etapas de reacción hasta formar dióxido de carbono.

Procesamiento de D-xilosa en S. cerevisiae

En trabajos de Kötter y Ciriacy (1993) se construyó por primera vez una cepa de *S. cerevisiae* recombinante que estaba en condiciones de metabolizar D-xilosa. Para ello, los genes de la levadura *Pichia stipitis* codificadores de D-xilosa-reductasa (*XYL1*) y xilitol deshidrogenasa (*XYL2*) fueron expresados de forma heteróloga en la levadura *S. cerevisiae*. En trabajos posteriores se sobre-expresó adicionalmente la xiluloquinasa (*XKS1*) endógena, lo cual mejoró la absorción de D-xilosa en la célula, así como su conversión en etanol (Ho *et al.*, 1998; Eliasson *et al.*, 2000). A pesar de las mejoras alcanzadas, el producto secundario principal de la conversión de xilosa era, bajo las condiciones limitantes de oxígeno, xilitol. A éste se le asocia un desequilibrio en el equilibrio redox, el cual es provocado debido a que la reacción que discurre primero en la vía metabólica aprovecha preferiblemente NADPH, pero la segunda reacción produce casi exclusivamente NADH (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Bajo condiciones aerobias, el NADH formado por la xilitol-deshidrogenasa puede ser regenerado a través de la cadena respiratoria para formar NAD. Bajo condiciones anaerobias, el NAD no puede ser regenerado y se produce una acumulación de NADH en la célula. Sin el co-factor NAD, la xilitol-deshidrogenasa no puede continuar convirtiendo xilitol en xilulosa.

A pesar de que la xilosa-reductasa utilizada en el trabajo mencionado procede de *P. stipitis*, que está en condiciones de aprovechar junto a NADPH también NADH como co-factor (Metzger y Hollenberg, 1995), se produce, bajo condiciones estrictamente anaerobias, el agotamiento de la fermentación de xilosa.

Una solución del problema consistía en introducir una vía metabólica redox neutra en *S. cerevisiae*. En procariotas, la conversión de xilosa en xilulosa tiene lugar a través de la enzima xilosa-isomerasa (*XI*). Para una conversión completa de la D-xilosa debería expresarse en *S. cerevisiae* adicionalmente sólo el gen *XI*, dado que está presente una xiluloquinasa endógena. A pesar de que se pudo determinar en algunos hongos una xilosa-isomerasa (Tomoyeda y Horitsu, 1964; Vongsuvanglert y Tani, 1988; Banerjee *et al.*, 1994; Rawat *et al.*, 1996), en eucariotas sólo se había demostrado la degradación de xilosa a través de las enzimas xilosa-reductasa y xilitol-deshidrogenasa. Fracasaron muchos esfuerzos para expresar de manera heteróloga una xilosa-isomerasa de diferentes organismos en levaduras (Gardonyi y Hahn-Hägerdal, 1993). La mayor parte de las veces, las enzimas no eran funcionales en levaduras o no se sintetizaron para formar proteínas (Sarthy *et al.*, 1987; Amore *et al.*, 1989; Moes *et al.*, 1996). Con una elevada actividad sólo pudo expresarse en levaduras la xilosa-isomerasa procedente del hongo obligadamente anaerobio *Piromyces* sp. E2 (Kyper *et al.*, 2003). En el caso de una sobre-expresión heteróloga de esta xilosa-isomerasa eucariótica (Harhangi *et al.*, 2003), *S. cerevisiae* estaba en condiciones de desarrollarse sobre xilosa y de metabolizarla también bajo condiciones anaerobias (Kuyper *et al.*, 2003). Ensayos adicionales demostraron, no obstante, que la enzima es fuertemente inhibida por parte de xilitol, un producto de la conversión de xilosa. El xilitol se forma de manera no específica en levaduras a partir de xilosa mediante aldosa-reductasas.

Los documentos ("WO 03/062430" (D1); "Antonius J A Van Maris *et al.*, Kluwer Academic Publishers, DO, tomo 90, Nº 4, 11, octubre de 2006, páginas 391-418" (D2), "Kuyper M *et al.*, Fems Yeast Research, Elsevier Science, Tokio, NL, tomo 4, Nº 6, 1 de marzo de 2004, páginas 655-664" (D4); "Walfridsson M. *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, American Society For Microbiology, US, tomo 62, Nº 12, 1 de diciembre de 1996, páginas 4648-4651" (D5); "Wiedemann Beate *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, American Society for Microbiology, US, tomo 74, Nº 7, 1 de abril del 2008, páginas 2043-2050" (D7)) describen todos la transformación de células de levadura con ADN que codifica la enzima xilosa-isomerasa de diferentes organismos (D1 y D4: de *Piromyces* sp, D5 de *Thermus thermophilus*, D2 es un artículo de revisión que describe el empleo de la enzima de diferentes organismos) y el uso de estos transformantes para la producción de, p. ej., bioetanol.

El documento US 6.475.768 describe el uso de una xilosa-isomerasa termófila procariótica de *Thermus thermophilus* o bien variantes de ésta para la metabolización de xilosa por parte de levaduras. El óptimo de temperatura de esta enzima o bien de las variantes se encuentra en una temperatura (> 70°C) que es claramente superior a la temperatura a la que se desarrolla y metaboliza la levadura (28-35°C), a temperaturas por encima de 40°C la levadura es, sin embargo, inactiva o bien muere. A temperaturas en torno a 30°C, la xilosa-isomerasa de *Thermus thermophilus* o bien las variantes son, sin embargo, casi inactivas. Por lo tanto, tampoco esta enzima o bien su variante de la levadura permite una metabolización eficaz de xilosa.

Existe, por lo tanto, necesidad en el estado conocido de la técnica de pentosa-isomerasas, en particular xilosa-isomerasas que posibiliten una conversión de pentosa, en particular una conversión de xilosa mejorada y más eficaz.

Por lo tanto, misión de la presente invención es proporcionar pentosa-isomerasas, en particular xilosa-isomerasas mejoradas para su uso en la conversión de xilosa que puedan utilizarse particularmente para las cepas de levadura industriales.

Construcciones de xilosa-isomerasa (XI) y su uso

El problema se resuelve, conforme a la invención, mediante la habilitación de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica para

- la transformación de una célula, preferiblemente para la expresión recombinante y para la preparación de la xilosa-isomerasa,
- 5 - la conversión de xilosa en xilulosa por parte de la célula y/o
- la formación de productos consecutivos de reacción a partir de xilosa por parte de la célula.

En particular, para los siguientes usos:

- la transformación de una célula, preferiblemente para la expresión/preparación recombinante de la xilosa-isomerasa procariótica,
- 10 - la conversión/metabolización, en este caso en particular fermentación, de biomaterial con contenido en xilosa,
- la preparación de compuestos químicos de origen biológico,
- la preparación de biobutanol,
- la preparación de bioetanol.

15 Por “productos consecutivos de reacción” se han de entender los compuestos que la célula produce adicionalmente a partir de la xilosa convertida en xilulosa tales como, por ejemplo, compuestos químicos de origen biológico y bioalcoholes.

Por “Compuestos químicos de origen biológico” se han de entender compuestos químicos y sustancias que se obtienen a partir de materiales biológicos y materias primas (biomasa), en particular utilizando microorganismos.

20 En el caso de los compuestos de origen biológico puede tratarse de un compuesto que se elige pero no se limita a: ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides o la molécula precursora amorfadieno del principio activo anti-malaria artemisinina.

25 Los términos “conversión” y “metabolización” se utilizan de manera sinónima y significan la metabolización de una sustancia o bien conversión de una sustancia en el metabolismo, en este caso: la conversión de xilosa, en particular la conversión de xilosa en xilulosa por parte de una célula que fue transformada con un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Una conversión/metabolización preferida es la fermentación.

30 En el caso de las moléculas de ácido nucleico se trata de moléculas de ácido nucleico recombinantes. Además de ello, moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprenden ADNds, ADNss, APN, ACN, ARN o ARNm, o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con una forma de realización, la presente invención se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 5.

La xilosa-isomerasa (XI) procariótica de acuerdo con la invención procede de *Clostridium phytofermentans*.

35 En esta invención se ha conseguido, con un sistema de ensayo, expresar una xilosa-isomerasa procariótica altamente funcional de *Clostridium phytofermentans* en la levadura *S. cerevisiae*. Se pudo demostrar que las levaduras recombinantes de xilosa-isomerasa encontradas posibilitan una metabolización eficiente de xilosa.

40 La xilosa-isomerasa (XI) procariótica de acuerdo con la invención puede expresarse en células, en particular en células eucarióticas en una forma activa. Además, la xilosa-isomerasa (XI) procariótica de acuerdo con la invención es menos sensible frente a una inhibición por parte de xilitol que la xilosa-isomerasa eucariótica conocida del estado de la técnica procedente de un hongo anaerobio.

Si la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, que codifica xilosa-isomerasa (XI) procariótica, es expresada en una célula, entonces se confiere a la célula la capacidad de transformar xilosa en xilulosa que luego puede continuar siendo metabolizada. Con ello, la célula está en condiciones de crecer sobre xilosa como fuente de carbono.

- Preferiblemente la xilosa-isomerasa (XI) procariótica de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica y todavía más preferiblemente un 99% idéntica o idéntica con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO. 1.
- 5 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica comprende preferiblemente una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 95% idéntica y todavía más preferiblemente un 99% idéntica o idéntica con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO. 2.
- Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprenden preferiblemente secuencias de ácidos nucleicos que son idénticas a la secuencia de ácidos nucleicos que se presentan de forma natural o están optimizadas en codones para un uso en una célula huésped.
- 10 Cada uno de los aminoácidos es codificado en el plano del gen por codón. Sin embargo, existen varios codones diferentes que codifican un único aminoácido. El código genético es, por consiguiente, degenerado. La elección preferida del codón para un aminoácido correspondiente es diferente de un organismo a otro. Así, en el caso de genes expresados de forma heteróloga pueden aparecer problemas cuando el organismo huésped o bien la célula huésped presente un uso de codón muy diferente. El gen no puede ser expresado en absoluto o sólo puede hacerse lentamente. Incluso en genes de diferentes vías metabólicas dentro de un organismo se puede comprobar un uso diferente del codón. De los genes de la glucólisis de *S. cerevisiae* es conocido que son fuertemente expresados. Presentan un uso del codón fuertemente restrictivo. Se ha de partir del hecho de que mediante la adaptación del uso del codón del gen xilosa-isomerasa bacteriano al uso del codón de los genes de la glucólisis de *S. cerevisiae* se produce una mejora de la conversión de xilosa en levaduras.
- 15 20 En una forma de realización preferida, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica comprende una secuencia de ácidos nucleicos que está optimizada en el codón para el uso en una célula huésped.
- La optimización en el codón consiste esencialmente de manera preferida en una adaptación del uso del codón al uso del codón del organismo huésped/células huésped tal como levaduras. Preferiblemente, el uso del codón del gen xilosa-isomerasa bacteriano está adaptado al uso del codón de los genes de la glucólisis de *S. cerevisiae*. Para detalles adicionales, véanse también el Ejemplo 2 y la Tabla 1.
- 25 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica comprende preferiblemente una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 95% idéntica y todavía más preferiblemente un 99% idéntica o idéntica con la secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ ID NO. 3.
- 30 Preferiblemente, la molécula de ácidos nucleicos utilizada de acuerdo con la invención es una construcción de expresión de ácidos nucleicos.
- Construcciones de expresión de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención son, por ejemplo, casetes de expresión que comprenden una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o vectores de expresión que comprenden una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o una casete de expresión.
- 35 Preferiblemente, una construcción de expresión de ácidos nucleicos comprende secuencias de promotor y terminador, estando el promotor operativamente unido con la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica.
- Secuencias de promotor preferidas se eligen de HXT7, HXT7 acortado, PFK1, FBA1, PGK1, ADH1 y TDH3.
- Secuencias de terminador preferidas se eligen de CYC1, FBA1, PGK1, PFK1, ADH1 y TDH3.
- 40 La construcción de expresión de ácidos nucleicos puede comprender, además, secuencias de reconocimiento 5' y/o 3' y/o marcadores de selección.
- Preferiblemente, el marcador de selección se elige de un gen marcador LEU2, un gen marcador URA3 o un gen marcador de resistencia a antibióticos dominante. Un gen marcador de resistencia a antibióticos dominante preferido se elige de genes que confieren resistencias frente a geneticina, higromicina y nourseotricina.
- 45 Un vector de expresión puede elegirse del grupo pRS303X, p3RS305X, p3RS306X, pRS41H, pRS41K, pRS41N, pRS42H, pRS42K, pRS42N o p423HXT7-6HIS, p424HXT7-6HIS, p425HXT7-6HIS, p426HXT7-6HIS.
- Preferiblemente, la célula a transformar es un microorganismo eucariótico, preferiblemente una célula de levadura o una célula de un hongo hifomiceto.

La célula de levadura es preferiblemente un miembro de un gen elegido del grupo de *Saccharomyces*, *Kuyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, *Arxula* y *Yarrowia*.

5 La célula de levadura es, más preferiblemente, un miembro de una especie elegida del grupo de *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *K. fragilis*.

La célula del hongo hifomiceto es preferiblemente un miembro de un gen elegido del grupo de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* y *Penicillium*.

Células fermentadoras de xilosa

10 El problema se resuelve, de acuerdo con la invención, mediante la habilitación de células según una de las reivindicaciones 6 a 9 que están transformadas con una construcción de expresión de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica.

Una célula de acuerdo con la invención es preferiblemente una célula eucariótica.

Una célula de acuerdo con la invención, en particular una célula eucariótica, está transformada con una construcción de expresión de ácidos nucleicos, que comprende:

- 15 (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica,
- (b) un promotor unido de forma operativa con la secuencia de ácidos nucleicos que

posibilita la expresión de la xilosa-isomerasa (XI) procariótica en la célula.

En este caso, la expresión de la construcción de expresión de ácidos nucleicos confiere a la célula la capacidad de isomerizar xilosa directamente en xilulosa.

20 Tal como se ha comentado arriba, la xilosa-isomerasa (XI) procariótica de acuerdo con la invención puede ser expresada en células, en particular células eucarióticas, en una forma activa, de modo que las células pueden, por consiguiente, isomerizar xilosa directamente en xilulosa (véase también la Figura 2).

25 Además, las xilosa-isomerasas (XI) procarióticas de acuerdo con la invención son menos sensibles frente a una inhibición por parte de xilitol que las xilosa-isomerasas eucarióticas conocidas del estado de la técnica procedentes de un hongo anaerobio.

Los autores de la invención han introducido en *S. cerevisiae* una vía metabólica redox neutra, en la que la conversión de xilosa en xilulosa tiene lugar mediante una xilosa-isomerasa (XI) (Fig. 2).

30 Cuando la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, que codifica la xilosa-isomerasa (XI) procariótica, es expresada en una célula, entonces se confiere a la célula la capacidad de transformar xilosa en xilulosa, la cual puede luego continuar siendo metabolizada. Con ello, la célula está en condiciones de crecer sobre xilosa como fuente de carbono.

35 La xilosa-isomerasa (XI) procariótica de acuerdo con la invención procede preferiblemente de *Clostridium phytofermentans*. Preferiblemente, la xilosa-isomerasa (XI) de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% idéntica, preferiblemente al menos un 80% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, todavía más preferiblemente al menos un 95% idéntica y aún más preferiblemente un 99% idéntica o idéntica con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO. 1.

El promotor (b) se elige preferiblemente de HXT7, HXT7 acortado, PFK1, FBA1, PGK1, ADH1 y TDH3.

40 En una forma de realización preferida, la construcción de expresión de ácidos nucleicos, con la que está transformada una célula de acuerdo con la invención, es una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención tal como se define en esta memoria arriba.

Preferiblemente, la célula de acuerdo con la invención es un microorganismo eucariótico, preferiblemente una célula de levadura o una célula de un hongo hifomiceto.

45 Una célula de levadura de acuerdo con la invención es preferiblemente un miembro del género elegido del grupo de *Saccharomyces*, *Kuyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, *Arxula* y *Yarrowia*.

Una célula de levadura de acuerdo con la invención es, más preferiblemente, un miembro de una especie elegida del grupo de *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *K. fragilis*.

Una célula de levadura de acuerdo con la invención es más preferiblemente la cepa Ethanol Red™ o Lallemand 1.

- 5 Una célula de un hongo hifomiceto de acuerdo con la invención es preferiblemente un miembro de un gen elegido del grupo de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* y *Penicillium*.

Preferiblemente, la célula de acuerdo con la invención es una célula mantenida en cultivo celular o bien una célula cultivada.

- 10 Las células de acuerdo con la invención están transformadas de forma transitoria o estable con la construcción de expresión de ácidos nucleicos o con la molécula de ácidos nucleicos tal como se define en esta memoria.

En una forma de realización, una célula de acuerdo con la invención expresa además, una o varias enzimas que confieren a la célula la capacidad de producir uno o varios de otros productos de la metabolización.

- 15 Un producto de la metabolización adicional de este tipo se elige en este caso preferiblemente de, pero no se limita al grupo de compuestos químicos de origen biológico tales como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides o la molécula precursora amorfadieno del principio activo anti-malaria artemisinina.

- 20 El problema se resuelve, de acuerdo con la invención, mediante el uso de las células de acuerdo con la invención según la reivindicación 10 para la reacción/metabolización, en este caso, fermentación, de biomaterial con contenido en xilosa y/o la preparación de bioetanol.

El problema se resuelve de acuerdo con la invención mediante el uso de las células de acuerdo con la invención correspondientes según la reivindicación 11 para la reacción/metabolización, en este caso, en particular la fermentación, de biomaterial con contenido en xilosa y/o para la producción de un producto de la metabolización.

- 25 El producto de la metabolización se elige preferiblemente del grupo de compuestos químicos de origen biológico (pero no está limitado a este grupo de compuestos químicos de origen biológicos) tales como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides o la molécula precursora amorfadieno del principio activo anti-malaria artemisinina.

- 30 El problema se resuelve, de acuerdo con la invención, mediante la habilitación de un procedimiento para la producción de bioetanol según una de las reivindicaciones 12 a 14.

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

(a) reacción de un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula de acuerdo con la invención que convierte xilosa en etanol,

(b) opcionalmente, obtención del bioetanol.

- 35 El bioetanol se obtiene, por ejemplo, mediante aislamiento.

El medio puede contener también otra fuente de carbono adicional, en este caso, en particular, glucosa.

Preferiblemente, la producción de bioetanol tiene lugar con una tasa de al menos 0,03 g de etanol por g en peso en seco de levadura y hora.

Preferiblemente, el rendimiento en etanol es de al menos 0,3 g de etanol por g de xilosa.

- 40 El problema se resuelve de acuerdo con la invención mediante la habilitación de un procedimiento para la producción de un producto de metabolización según la reivindicación 15.

- 45 Un producto de metabolización adicional de este tipo se elige en este caso preferiblemente de, pero no se limita al grupo de compuestos químicos de origen biológico tales como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides o la molécula precursora amorfadieno del principio activo anti-malaria artemisinina.

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

(a) reacción/metabolización, en particular fermentación, de un medio que contiene una fuente de xilosa, con una correspondiente célula de acuerdo con la invención que convierte xilosa con el fin de producir el producto de metabolización,

5 (b) opcionalmente, obtención del producto de metabolización.

El producto de metabolización se obtiene, por ejemplo, mediante aislamiento.

El medio puede contener también otra fuente de carbono adicional, en este caso, en particular, glucosa.

Los autores de la invención han conseguido introducir en *S. cerevisiae* una vía de metabolismo redox neutra, en la que la conversión de xilosa en xilulosa tiene lugar mediante una xilosa-isomerasa (XI) (Fig. 2).

10 En esta invención se ha conseguido con un sistema de ensayo expresar en la levadura *S. cerevisiae* una xilosa-isomerasa procariótica muy funcional de *Clostridium phytofermentans*. Se pudo demostrar que la xilosa-isomerasa encontrada posibilita a las levaduras recombinantes una metabolización eficiente de xilosa.

Además, durante el hallazgo de una xilosa-isomerasa funcional se pudo superar una pluralidad de trabas y dificultades experimentales:

15 - Para la construcción de la cepa de ensayo MKY09 hubo de sobre-expresar 5 genes.

- La elección de las xilosa-isomerasas a ensayar no era trivial.

- Todas las xilosa-isomerasas bacterianas hasta ahora sometidas a ensayo no mostraron en levaduras ninguna hasta una muy baja actividad.

- Elevada complejidad en el cultivo de los organismos a ensayar que se requirieron para el rastreo.

20 - En el caso de la xilosa-isomerasa de acuerdo con la invención se trata de la primera xilosa-isomerasa procariótica altamente activa descrita en levaduras.

- En el caso de la xilosa-isomerasa de acuerdo con la invención se trata de la primera xilosa-isomerasa del racimo II (de tres racimos) de xilosa-isomerasas (véase la Figura 3) que podía ser expresada funcionalmente en levaduras.

- La xilosa isomerasa de acuerdo con la invención es inhibida sólo ligeramente por parte de xilitol.

25 Sobre las dificultades en relación con la expresión funcional de xilosa-isomerasas en levaduras existen algunos informes (Gárdonyi y Hahn-Hägerdahl, 2003; así como las fuentes citadas en ellos).

Los autores de la invención han conseguido, por vez primera, expresar una xilosa-isomerasa procariótica en forma funcional en levaduras, de modo que a éstas se las capacita para metabolizar xilosa bajo condiciones fisiológicas y en cantidades significativas y transformarla en productos (p. ej., etanol). Tal como se describe en el estado de la técnica, esto no trivial. Para ello, se llevaron a cabo numerosos ensayos, y todos ellos fueron hasta ahora infructuosos (véase Sarthy *et al.*, 1987; Amore *et al.*, 1989; Moes *et al.*, 1996, documento US 6.475.768). Los autores de la invención han conseguido ahora demostrar que precisamente la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans*, a diferencia de todas las enzimas procarióticas hasta ahora conocidas, confiere la capacidad a la levadura de metabolizar xilosa bajo condiciones fisiológicas y en cantidades significativas y preparar a partir de ello productos.

Ejemplos de hidrolizados lignocelulósicos con una proporción significativa de xilano (Hayn *et al.*, 1993):

Hierba:	16%
Salvado de trigo:	19%
Residuos del maíz:	19%

40 La presente invención se explica adicionalmente en las siguientes figuras, secuencias y Ejemplos, sin que, sin embargo, se limite a los mismos. Las referencias citadas están recogidas con ello por completo como referencia. En las secuencias y figuras, muestran:

SEQ ID NO: 1 la secuencia de proteínas del ORF (marco de lectura abierto) de xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans*,

(véase también Genbank N°s de acceso ABX41597 y CP000885 (del 19 de noviembre de 2007)),

SEQ ID NO: 2 la secuencia de ácidos nucleicos del marco de lectura abierto (ORF) de la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans*,

(véase también Genbank N° de acceso CP000885 (del 19 de noviembre del 2007)),

- 5 SEQ ID NO: 3 la secuencia de ácidos nucleicos del marco de lectura abierto (ORF) de la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans* en una forma optimizada en codones.

Figura 1. Composición de la biomasa

La biomasa se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa que se presenta en segundo lugar con mayor frecuencia es un polímero fuertemente ramificado consistente en pentosas, ácidos urónicos y hexosas. La hemicelulosa se compone en una gran parte de las pentosas xilosa y arabinosa.

Figura 2. Esquema para la conversión de D-xilosa en *S. cerevisiae* recombinante a través de isomerización directa

Figura 3. Árbol genealógico de las distintas xilosa-isomerasas

Se muestra el árbol genealógico de las xilosa-isomerasas sometidas a ensayo. Comparaciones en cuanto a la similitud de las xilosa-isomerasas se llevaron a cabo con el programa "MEGA version 4".

15 **Figura 4. Vectores utilizados**

El plásmido de partida para la construcción de p426H7-XI-Clos (B) o bien p426H7-opt.XI-Clos (C) era el plásmido p426HXT7-6HIS (A). En el caso del vector p426HXT7-6HIS se trata de un plásmido de expresión de 2 μ que posee un marcador *URA3*. El marco de lectura abierto (ORF) o bien su forma optimizada en codones de la xilosa-isomerasa de acuerdo con la invención de *C. phytofermentans* se clonó detrás del promotor *HXT7* fuertemente acortado y el terminador *CYC1* del plásmido p426HXT7-6HIS.

Figura 5. Comportamiento de crecimiento en medio con contenido en xilosa utilizando los diferentes genes de xilosa-isomerasa

Ensayos de crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* recombinantes que contienen el metabolismo de D-xilosa bacteriano con la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans*. Los ensayos de crecimiento se llevaron a cabo en placas de agar con medio SC y con xilosa al 2% como única fuente de carbono. Se sometió a ensayo la forma nativa (B) y la forma optimizada en codones (C) de la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans*. Como control negativo servía el vector vacío p426HXT7-6HIS (A).

Figura 6. Conversión de xilosa en cepas de levadura recombinantes utilizando una xilosa-isomerasa bacteriana

Se sometió a ensayo la conversión de xilosa de células de levadura recombinantes MKY09, que contenían la forma nativa y la forma optimizada en codones de la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans*. Como comparación servía el vector p426HXT7-6HIS vacío. Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo en medio SC líquido con xilosa al 1,4% bajo condiciones aerobias. Muestras de HPLC se tomaron paralelamente a la medición de la densidad óptica a 600 nm. Véase también la Tabla 2, Ejemplo 3.

Figura 7. Cinéticas enzimáticas

35 **Diagrama de Eadie-Hofstee de la conversión de xilosa de las xilosa-isomerasas nativas y optimizadas en codones de *C. phytofermentans*.**

La cepa CEN.PK2-1C transformada con el plásmido p426H7-XI-Clos o bien p426H7-opt.XI-Clos se cultivó durante una noche en medio completo sintético con glucosa al 2% sin uracilo. Se prepararon extractos brutos y se llevaron a cabo ensayos enzimáticos cuantitativos. Se muestra un resultado representativo. Los valores indicados en la Tabla 3 son valores medios de al menos tres mediciones independientes.

Ejemplos

Métodos

1. Cepas y medios

- Bacterias

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

otros organismos

- *Arabidopsis thaliana* (ADN genómico)

Medios y cultivo de *E. coli*

Medio completo LB:

- 20 1% de triptona, 0,5% de extracto de levaduras, 0,5% de NaCl, pH 7,5 (véase Maniatis, 1982).

Para la selección a una resistencia a antibióticos codificada por plásmidos se añadieron al medio, después de someterlo a autoclave, 40 μ g/ml de ampicilina. Medios nutricios sólidos recibieron adicionalmente agar al 2%. El cultivo tuvo lugar a 37°C.

Medios y cultivo de otras bacterias

- 25 Para la composición de los medios y de las condiciones de cultivo, véanse los datos de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania).

- Levaduras

Cepa CEN, PK2-1C

CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3- Δ 1MAL2-8c SUC2*)

- 30 Cepa MKY09

MKY09 se basa en la cepa CEN.PK2-1 C (*MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- Δ 1MAL2-8c SUC2, PromTKL1::loxP-Prom-vkHXT7, PromRPE1::loxP-Prom-vkHXT7, PromRK11::loxP-Prom-vkHXT7, PromGAL2::loxP-Prom-vkHXT7, PromXKS1::loxP-Prom-vkHXT7*), contiene otras mutaciones desconocidas.

Medios y cultivo de levaduras

- 35 Medio selectivo completo sintético SC

base nitrogenada de levaduras al 0,67% sin aminoácidos, pH 6,3, disolución de aminoácidos/nucleobase, fuente de carbono en la concentración indicada en cada caso

Medio selectivo mínimo sintético SM:

base nitrogenada de levaduras al 0,16% sin aminoácidos y sulfato de amonio, sulfato de amonio al 0,5%, dihidrógeno-fosfato de potasio 20 mM, pH 6,3, fuente de carbono en la concentración indicada en cada caso

- 5 Concentración de los aminoácidos y nucleobases en el medio completo sintético (según Zimmermann, 1975): adenina (0,08 mM), arginina (0,22 mM), histidina (0,25 mM), isoleucina (0,44 mM), leucina (0,44 mM), lisina (0,35 mM), metionina (0,26 mM), fenilalanina (0,29 mM), triptófano (0,19 mM), treonina (0,48 mM), tirosina (0,34 mM), uracilo (0,44 mM), valina (0,49 mM). Como fuente de carbono se emplearon L-arabinosa y D-glucosa.

2. Plásmidos

- 10 Plásmidos utilizados

Plásmido	Fuente/Referencia	Descripción
p426HXT7-6HIS (= p426H7)	Hamacher <i>et al.</i> , 2002	Plásmido de expresión de 2 μ para la sobre-expresión de genes y para la preparación de un epítipo His ₆ ; gen marcador de selección <i>URA3</i> , promotor <i>HXT7</i> acortado y terminador <i>CYC1</i>

Plásmidos construidos en el marco de este trabajo

Plásmido	Descripción
p426H7-XI-Agro	Clonación de la <i>XI</i> de <i>A. tumefaciens</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Arab	Clonación de la <i>XI</i> de <i>A. thaliana</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-BaLi	Clonación de la <i>XI</i> de <i>B. licheniformis</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Burk	Clonación de la <i>XI</i> de <i>B. xenovorans</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Clos	Clonación de la <i>XI</i> de <i>C. phytofermentans</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Clos	Clonación de la <i>XI</i> optimizada en codones de <i>C. phytofermentans</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Lacto	Clonación de la <i>XI</i> de <i>L. xyli</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Leif	Clonación de la <i>XI</i> optimizada en codones de <i>Pyromices</i> sp.E2 en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-opt.XI-Piro	Clonación de la <i>XI</i> de <i>P. syringae</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Pseudo	Clonación de la <i>XI</i> de <i>R. biformata</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Robi	Clonación de la <i>XI</i> de <i>S. degradans</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Saccha	Clonación de la <i>XI</i> de <i>S. typhimurium</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Salmo	Clonación de la <i>XI</i> de <i>S. xylosus</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Staph	Clonación de la <i>XI</i> de <i>S. diastaticus</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Strep	Clonación de la <i>XI</i> de <i>X. campestris</i> en p426HXT7-6HIS reponiendo el epítipo His ₆
p426H7-XI-Xantho	

3. Transformación:

- Transformación de *E. coli*

La transformación de las células de *E. coli* tuvo lugar mediante el método de electroporación según Dower *et al.* (1988) y Wirth (1993) mediante un aparato Easyject prima (EQUIBO).

5 - Transformación de *S. cerevisiae*

La transformación de cepas de *S. cerevisiae* con ADN del plásmido o bien fragmentos de ADN tuvo lugar según el método de acetato de litio de Gietz y Woods (1994).

4. Preparación de ADN

- Aislamiento de ADN del plásmido de *E. coli*

10 El aislamiento de ADN del plásmido de *E. coli* tuvo lugar según el método de la lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979), modificado según Maniatis *et al.* (1982) o, alternativamente, con el "QIAprep Spin Miniprep Kit" de la razón social Qiagen.

ADN del plásmido muy puro para secuenciaciones se preparó con el "Plasmid Mini Kit" de la razón social Qiagen según los datos del fabricante.

15 - Aislamiento de ADN del plásmido de *S. cerevisiae*

Las células de un cultivo de levadura estacionario (5 ml) se recolectaron mediante centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en 400 µl de tampón P1 (Plasmid Mini Kit, razón social Qiagen). Después de la adición de 400 µl de tampón P2 y 2/3 de volumen de perlas de vidrio (Ø 0,45 mm) tuvo lugar la disgregación de las células mediante sacudimiento durante 5 minutos en un aparato Vibrax (Vibrax-VXR de Janke & Kunkel o IKA). El sobrenadante se mezcló con ½ volumen de tampón P3, se mezcló y se incubó durante 10 min en hielo. Después de una centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm, mediante adición de 0,75 ml de isopropanol al sobrenadante, se precipitó el ADN del plásmido a temperatura ambiente. El ADN granulado mediante centrifugación durante 30 min a 13000 rpm se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 20 µl de agua. 1 µl del ADN se empleó para la transformación en *E. coli*.

25 - PCR de la colonia de *B. licheniformis* y *S. degradans*

Pequeñas cantidades de células se recogieron con ayuda de un mondadientes de cultivos de bacterias que se desarrollaban en placa y se transfirieron a un recipiente de reacción de PCR. Después de la adición de H₂O, dNTP-Mix 0,2 mM, tampón 1xPCR (contiene MgCl₂ 1,5 mM) y en cada caso 10 pmol del cebador de oligonucleótido correspondiente, tuvo lugar la disgregación de las células en un termociclador de la razón social Techne a 99°C durante 10 min. Esta tanda se empleó directamente como molde en una reacción PCR. Mediante la adición de 1 U de polimerasa se inició la reacción en cadena de la polimerasa con un volumen total de 50 µl.

- Determinación de la concentración de ADN

35 La concentración de ADN se midió mediante fotometría espectral en un intervalo de longitudes de onda de 240-300 nm. Si la pureza del ADN, determinada mediante el cociente $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$, se encuentra en 1,8, entonces la extinción $E_{260\text{ nm}} = 1,0$ corresponde a una concentración de ADN de 50 µg de ADN/ml (Maniatis *et al.*, 1982).

- Amplificación de ADN mediante PCR

Uso del sistema Phusion™ High Fidelity

40 La reacción en cadena de la polimerasa tuvo lugar en un volumen total de 50 µl con el "sistema de PCR Phusion™ High Fidelity" de la razón social Finnzymes según los datos del fabricante. Cada una de las tandas consistía en 1-10 ng de ADN o 1-2 colonias de levadura como modelo de síntesis, mezcla de dNTP 0,2 mM, tampón 1x2 (contiene MgCl₂ 1,5 mM), 1 U de polimerasa y en cada caso 100 pmol del correspondiente cebador de oligonucleótidos. La reacción PCR se llevó a cabo en un termociclador de la razón social Techne y las condiciones de la PCR se eligieron según las necesidades como sigue:

1.	1x	30 s, 98°C	desnaturalización del ADN
45	2.	30x 10 s, 98°C	desnaturalización del ADN

	30 s, 52-62°C	re-asociación/unión de los oligonucleótidos al ADN
	50 s, 72°C	síntesis/alargamiento de ADN
3.	1x 7 min, 72°C	síntesis/alargamiento de ADN

5 Después de la primera etapa de desnaturalización, se añadió la polimerasa ("PCR de arranque en caliente"). El número de las etapas de síntesis, la temperatura de re-asociación y el tiempo de alargamiento se adaptaron a las temperaturas de fusión específicas de los oligonucleótidos utilizados o bien al tamaño del producto a esperar. Los productos de la PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa y a continuación se purificaron.

- Purificación de ADN de productos de la PCR

10 La purificación de los productos de la PCR tuvo lugar con un kit "QIAquick PCR Purification" de la razón social Qiagen según los datos del fabricante.

- Separación por electroforesis en gel de fragmentos de ADN

15 La separación de fragmentos de ADN con un tamaño de 0,15-20 kb tuvo lugar en geles de agarosa al 0,5-1% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Como tampón de gel y de desarrollo se utilizó tampón 1xTAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 2 mM) (Maniatis *et al.*, 1982). Como patrón de magnitud servía un ADN del fago lambda cortado con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Las muestras de ADN se mezclaron, antes de aplicación, con 1/10 volumen de marcador azul (tampón 1xTAE, glicerol al 10%, azul bromofenol al 0,004%) y después de la separación se hicieron visibles mediante radiación con luz UV (254 nm).

- Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa

20 El fragmento de ADN deseado se cortó del gel de agarosa TAE bajo luz UV de onda larga (366 nm) y se aisló con el kit "QIAquick Gel Extraction" de la razón social Qiagen según los datos del fabricante.

5. Modificación enzimática de ADN

Restricción de ADN

La disociación específica para la secuencia del ADN con endonucleasas de restricción se llevó a cabo bajo las condiciones de incubación aconsejadas por el fabricante durante 1 hora con 2 -5 U de enzima por µg de ADN.

25 6. Análisis de los metabolitos

30 En diferentes momentos se tomaron muestras y se separaron por centrifugación a 4°C durante 15 min a 13000 rpm y del sobrenadante se tomaron 450 µl. La precipitación de proteínas se llevó a cabo con ácido sulfosalicílico al 50%. 1/10 del volumen de ácido sulfosalicílico se añadió a las muestras, se mezcló y se separó por centrifugación durante 20 min a 13000 rpm a 4°C. El sobrenadante se recogió y después de una dilución ulterior con agua se podían emplear las muestras para la medición. Como patrones servían muestras con D-glucosa, D-xilosa, xilitol, acetato, glicerol y etanol que se emplearon en concentraciones de 0,05% p/v, 0,1% p/v, 0,5% p/v, 1,0% p/v y 2,0% p/v.

Las concentraciones de azúcar, así como la concentración de etanol se midieron mediante BioLC (Dionex). Se utilizó en la medición el automuestreador "AS50", el horno de columna "TCC-100", el detector RI "RI-101" (Shodex) y la bomba de gradiente "GS50".

35 La medición de las muestras se llevó a cabo con la columna VA 300/7.7 Nucleogel Sugar 810 H (Macherey Nagel). La columna se eluyó a una temperatura de 65°C con H₂SO₄ 5 mM como eluyente y un caudal de 0,6 ml min⁻¹. La evaluación de los datos tuvo lugar con el programa Chromeleon versión 6.50™ (versión 6.50, Dionex).

7. Medición de actividades enzimáticas en *S. cerevisiae*

- Preparación de extractos en bruto

40 Cultivos de 50 ml de células de levadura se hicieron crecer hasta la fase exponencial en medio mínimo sintético con glucosa al 2%. Las células se recolectaron, se lavaron dos veces en tampón Tris-HCl (pH 7,5) y se disgregaron con ayuda de perlas de vidrio (Ø = 0,45 mm) durante 8 min en un aparato Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) a 4°C. Los fragmentos de células se separaron mediante centrifugación durante 10 min a 13000 rpm. A continuación, se retiró el sobrenadante y se completó con tampón Tris-HCl frío (pH 7,5) hasta 2 ml y se empleó como extracto bruto para la determinación de proteínas y para la medición de las actividades enzimáticas o bien inhibición de xilitol.

45

- Determinación de proteínas

5 La concentración de proteínas se determinó con el kit "Roti-Quant" de la razón social Carl Roth GmbH + Co. según los datos del fabricante basados en Bradford (1976). Como patrón servía en este caso albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 0-100 µg/ml. Después de un tiempo de incubación de al menos 5 min a temperatura ambiente, las muestras se midieron en placas de microtitulación con un fotómetro de placas de titulación de la razón social Molecular Devices a DO₅₉₀.

- Medición de la actividad de xilosa-isomerasa

10 Para la determinación de la actividad de xilosa-isomerasa se cultivaron células de levadura recombinantes que contenían el vector p426HT7-XI-Clos o bien p426H7-opt.XI-Clos, se recolectaron y se prepararon extractos brutos. Como comparación servían células de levadura recombinantes que contenían el vector p426HXT7-6HIS vacío. En un volumen total de 1 ml se vigiló continuamente la reacción de xilosa 6,25-500 mM con 100 µl de extracto bruto, NADH 0,23 mM, MgCl₂ 10 mM, 2 U de sorbitol-deshidrogenasa en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). La disminución de NADH como magnitud de medida se determinó por espectrofotometría espectral a una longitud de onda de 340 nm. La reacción se inició mediante la adición de xilosa.

15 - Medición de la inhibición de xilitol

20 Para la determinación de la inhibición de xilitol de la xilosa-isomerasa se cultivaron células de levaduras recombinantes que contenían el vector p426H7-opt.XI-Clos, se recolectaron y se prepararon extractos brutos. Como comparación servían células de levadura recombinantes con el vector p426H7-opt.XI-Piro o bien el vector p426HXT7-6HIS. En un volumen total de 1 ml se vigiló continuamente la reacción de xilosa 6,25-500 mM con 100 µl de extracto bruto, xilitol 10-100 mM, NADH 0,23 mM, MgCl₂ 10 mM, 2 U de sorbitol-deshidrogenasa en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). La disminución de NADH como magnitud de medida se determinó por espectrofotometría espectral a una longitud de onda de 340 nm. La reacción se inició mediante la adición de xilosa.

Ejemplo 1: Rastreo de una xilosa-isomerasa procariótica (altamente) funcional**A) Construcción de la MKY09**

25 En la cepa de levaduras CEN.PK2-1C se sobre-expresaron todos los genes de la vía no oxidativa de fosfato de pentosa, así como la xiluloquinasa (*XKS1*) y *GAL2*. Para ello, los promotores endógenos fueron intercambiados por el promotor *HXT7* acortado. Esta cepa se denominó MKY09 y se empleó para el rastreo de xilosa-isomerasas funcionales.

B) Selección de las xilosa-isomerasas a ensayar

30 Con el fin de elegir una selección para las xilosa-isomerasas a ensayar se compararon secuencias de proteínas de xilosa-isomerasas del banco de datos NCBI BLAST. En la Fig. 3 se muestra un extracto de las xilosa-isomerasas obtenidas. Se eligieron 14 xilosa-isomerasas de diferentes organismos con el fin de someter a ensayo su funcionalidad en levaduras.

C) Realización del rastreo

35 Para ello, se aisló ADN genómico de los organismos. Las células se cultivaron, recolectaron y disgregaron (véase para ello "Aislamiento de ADN del plásmido de *S. cerevisiae*" o bien "PCR de la colonia de *B. licheniformis* y *S. degradans*). El marco de lectura abierto (ORF) de *XI* de los organismos mencionados se amplificó con cebadores que presentaban adicionalmente zonas homólogas con el promotor *HXT7* o bien el terminador *CYC1*. Junto con el vector p426HXT7-6HIS linealizado de *EcoRI/BamHI*, los productos de la PCR obtenidos se transformaron en levaduras y se clonaron a través de recombinación *in vivo* en el plásmido entre el promotor *HXT7* o bien el terminador *CYC1* (Fig. 4). La secuencia de los plásmidos obtenidos se verificó a través de análisis de restricción. Además, de las nuevas isomerasas se debía investigar la funcionalidad y su efecto sobre la conversión de xilosa en levaduras. A partir de los organismos *Streptomyces diastaticus* y *Leifsonia xyli* no se consiguió, sin embargo, amplificar el producto de la PCR deseado con la xilosa-isomerasa. Por consiguiente, no se pudieron examinar las dos xilosa-isomerasas en cuanto a la funcionalidad en levaduras.

D) Comportamiento en el crecimiento (placa)

De las 12 xilosa-isomerasas distintas sometidas a ensayo se encontró una xilosa-isomerasa que era funcional en la cepa de levaduras MKY09. Levaduras recombinantes que contenían xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans* mostraron un buen desarrollo sobre placas con contenido en xilosa (Fig. 5).

Ejemplo 2: Optimización en codones del gen para la degradación de xilosa en levaduras

A) Optimización en codones de genes después del uso de codones de los genes de la glucólisis de *S. cerevisiae*

5 Se determinó el consumo de codones preferido de los genes de glucólisis de *S. cerevisiae* y está listado en la Tabla 1. Se optimizó en codones el ORF del gen *XI* de *C. phytofermentans*. Es decir, las secuencias del marco de lectura abierto se adaptaron al uso preferido del codón indicado más adelante. La secuencia de proteínas de las enzimas permaneció invariable. Los genes se sintetizaron en una razón social externa y se proporcionaron en forma secada en vectores domésticos propios de la firma.

Datos más detallados sobre la síntesis de genes se encuentran en www.geneart.com.

10 **Tabla 1:** Uso preferido del codón de los genes glucolíticos de *S. cerevisiae*

Aminoácido	Uso del codón de genes optimizados en codones
Ala	GCT
15 Arg	AGA
Asn	AAC
Asp	GAC
Cys	TGT
Gln	CAA
20 Glu	GAA
Gly	GGT
His	CAC
Ile	ATT
Leu	TTG
25 Lys	AAG
Met	ATG
Phe	TTC
Pro	CCA
Ser	TCT
30 Thr	ACC
Trp	TGG
Tyr	TAC
Val	GTT
Terminación	TAA

B) Introducción del gen xilosa-isomerasa optimizado en codones en la cepa MKY09

Con el fin de someter a ensayo el gen xilosa-isomerasa optimizado en codones en la cepa MKY09, el gen hubo de sub-clonarse en un vector de levadura. Para ello, el ORF de XI optimizado en codones se amplificó con cebadores y se clonó en el vector p426HXT7-6HIS linearizado (véase "realización del rastreo"). La secuencia del plásmido p426H7-opt.XI-Clos obtenido se verificó a través de análisis de restricción. Para el ensayo de la funcionalidad de la isomerasa utilizada en codones, el plásmido p426H7-opt.XI-Clos se transformó en la cepa MKY09. Cepas de levaduras recombinantes mostraron en placas con medio con contenido en xilosa un buen desarrollo (Fig. 5). Siguieron caracterizaciones adicionales de las XI nativas y optimizadas en codones de *C. phytofermentans*.

Ejemplo 3: Caracterización de la xilosa-isomerasa procariótica funcional

A) Comportamiento en el crecimiento y conversión en xilosa

El crecimiento de la cepa MKY09 con la xilosa-isomerasa nativa y la optimizada en codones de *C. phytofermentans* se examinó en un ensayo de crecimiento en medio con contenido en xilosa bajo condiciones aerobias. Como comparación servía el vector p426HXT7-6HIS vacío.

Las cepas se cultivaron en medio SC con glucosa al 0,1% y xilosa al 1,4% y se inocularon con una $DO_{600\text{ nm}} = 0,2$ en 50 ml de medio SC con glucosa al 0,1% y xilosa al 1,4%. La incubación tuvo lugar en matraces de agitación bajo condiciones aerobias a 30°C. Se tomaron varias muestras para la determinación de la densidad óptica así como para la determinación de la composición del metabolito.

Las curvas de crecimiento demostraron que las levaduras recombinantes crecían todas en glucosa hasta una DO_{600} de 2,5 (Tabla 2). Después de otras 50 h, la cepa de levaduras que contenía la xilosa-isomerasa nativa de *C. phytofermentans*, empezó a crecer sobre xilosa y alcanzó una DO_{600} final de 3,5 con una tasa de crecimiento máxima de $0,0058\text{ h}^{-1}$ sobre medio con contenido en xilosa. La cepa de levadura con la xilosa-isomerasa optimizada en codones alcanzó asimismo una DO_{600} final de 3,5. La tasa de crecimiento máxima ascendió a $0,0072\text{ h}^{-1}$. Transformantes de levadura con el vector p426HXT7-6HIS vacío no presentaron crecimiento alguno sobre xilosa y comenzaron a morir ya después de 150 h.

Las levaduras recombinantes que contenían la xilosa-isomerasa nativa de *C. phytofermentans* o bien la xilosa-isomerasa optimizada en codones se convirtieron en 312 horas sobre 2,6 g de xilosa (Fig. 6).

Tabla 2. Determinación de la tasa de crecimiento máxima sobre xilosa (μ)

MKY09	tasa de crecimiento máx.
transformada con plásmido	
p426H7-XI-Clos	0,0058
p426H7-opt.XI-Clos	0,0072

Con el ensayo pudo demostrarse que la introducción de la xilosa-isomerasa nativa así como de la optimizada en codones de *C. phytofermentans* posibilita a las cepas de *S. cerevisiae* recombinantes el crecimiento sobre D-xilosa así como su conversión. Mediante la optimización en codones de la xilosa-isomerasa pudo alcanzarse una tasa de crecimiento mayor.

B) Medición de la actividad de xilosa-isomerasa

Se llevaron a cabo ensayos enzimáticos directamente después de la preparación del extracto bruto. La actividad XI se llevó a cabo a 30°C en una mezcla de reacción (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; $MgCl_2$ 10 mM, NADH 0,23 mM; sorbitol-deshidrogenasa 2 U) con diferentes concentraciones de extracto bruto. La reacción se inició con xilosa 6,25-500 mM.

La determinación de la cinética enzimática de la forma nativa de la xilosa-isomerasa proporcionó un valor K_m de $61,85 \pm 3,41$ mM y para la forma optimizada en codones un valor K_m de $66,01 \pm 1$ mM (Fig. 7 y Tabla 3). Como era de esperar, los valores K_m son por consiguiente iguales, dado que no se diferencian significativamente uno de otro.

5 $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg de proteína $^{-1}$) ascendió a 0,0076 para la forma nativa de la xilosa-isomerasa y a 0,0344 para la forma optimizada en codones (Fig. 7). Por consiguiente, mediante la optimización en codones de la enzima se pudo aumentar $V_{m\acute{a}x}$ por encima de 450%.

Tabla 3

CEN.PK2-1C	V máx.	Km
10 transformada con plásmido	($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg de proteína $^{-1}$)	(mM)
p426H7-XI-Clos	0,0076	61,85 \pm 3,4
15 p426H7-opt.XI-Clos	0,0344	66,01 \pm 1

La cepa CEN.PK2-1C transformada con el plásmido p426H7-XI-Clos o bien p426H7-opt.XI-Clos se cultivó durante una noche en medio completo sintético con glucosa al 2% sin uracilo. Se prepararon extractos brutos y se llevaron a cabo ensayos enzimáticos cuantitativos.

C) Medición de la inhibición de xilitol

20 La determinación de la inhibición de xilitol de las xilosa-isomerasas tuvo lugar directamente después de la preparación del extracto bruto. La actividad de XI se llevó a cabo a 30°C en una mezcla de reacción (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; NADH 0,23 mM; sorbitol-deshidrogenasa 2 U) con concentraciones diferentes de extracto bruto. Adicionalmente, en la mezcla de reacción se encontraban concentraciones diferentes de xilitol (10 - 100 mM). La reacción se inició con xilosa 6,25-500 mM.

25 K_i se determinó mediante la ecuación $K_m' = K_m * (1 + i/K_i)$, representando i la concentración de xilitol empleada y K_m' el valor K_m aparente con una concentración de xilitol correspondiente.

La determinación de las cinéticas de la inhibición de xilitol de la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans* proporcionó un valor K_i de $14,24 \pm 1,48$ mM (Tabla 4). Como ya se ha descrito múltiples veces (Yamanaka *et al.*, 1969 y fuentes citadas en el mismo) se trata de una inhibición competitiva.

30 **Tabla 4**

CEN.PK2-1C	Ki
transformada con plásmido	(mM)
35 p426H7-XI-Piro	4,67 \pm 1,77
p426H7-opt.XI-Clos	14,51 \pm 1,08

40 La cepa CEN.PK2-1C transformada con el plásmido p426H7-opt.XI-Clos o bien p426H7-opt.XI-Piro se cultivó durante una noche en medio completo sintético con glucosa al 2% sin uracilo. Se prepararon extractos brutos y se llevaron a cabo ensayos enzimáticos cuantitativos con concentraciones constantes de xilitol de 10-100 mM.

Como comparación servía la xilosa-isomerasa de *Piromyces* sp.E2 y el vector p426HXT7-6HIS vacío. El valor K_i determinado de la xilosa-isomerasa de *Piromyces* sp.E2 ascendió a $4,67 \pm 1,77$ mM.

A partir de los valores K_i determinados se desprende que la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans* es inhibida de manera significativamente en menor medida por parte de xilitol que la xilosa-isomerasa de *Piromyces* sp.E2.

5 **E) Ejemplos de vectores para la xilosa-isomerasa**

El plásmido de partida para la construcción de p426H7-opt.XI-Clos era el plásmido p426HXT7-6HIS. En el caso del vector se trata de un plásmido de expresión de 2 μ que posee un marcador *URA3*.

10 Otros vectores de expresión posibles son los de la serie pRS303X, p3RS305X y p3RS306X. En este caso se trata de vectores integrativos que poseen un marcador de antibióticos dominante. Datos más precisos de estos vectores se encuentran Taxis y Knop (2006).

Referencias

Amore, R., Wilhelm, M. y Hollenberg, C. P. (1989)

15 The fermentation of xylose - an analysis of the expression of Bacillus and Actinoplanes xylose isomerase genes in yeast.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**:351-357

Banerjee, S., Archana, A. y Satyanarayana, T. (1994)

Xylose metabolism in a thermophilic mould *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* TMD 8.

Curr. Microbiol. **29**:349-352

20 **Birnboim, H.C. y J. Doly (1979)**

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1523

Dower, W.J., Miller, J.F. y Ragsdale, C.W. (1988)

High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.

25 *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145

Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C.F. y Hahn-Hägerdal, B. (2000)

Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2* and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures.

Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3381-3386

30 **Gárdonyi, M. y Hahn-Hägerdahl, B. (2003)**

The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.

Enzym. Microb. Technol. **32**, 252-259

Gietz, R.D. y Woods, R.A. (1994)

High efficiency transformation in yeast.

35 En: *Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches*, J.A. Johnston (Ed.).

Oxford University Press págs. 121-134

Hahn-Hägerdal, B., Wahlborn, C.F., Gárdonyi, M., van Zyl, W., Otero, R.R.C. y Jönsson, L.J. (2001)

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization.

Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **73**:53-84

Harhangi, H.R. (2003)

Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. Strain E2 follows the bacterial pathway.

5 *Arch Microbiol.* **180**:134-141.

Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmuller, H., Sinner, M. y Esterbauer, H. (1993)

Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics.

En Bioconversion of forest and agricultural plant residues, ed. Saddler, J. N. (CAB international, Wallingford, UK), págs. 33-72.

10 **Ho, N.W.Y., Chen, Z. y Brainard, A.P. (1998)**

Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose.

Appl. Environ. Microbiol. **64**:1852-1859

Kötter, P. y Ciriacy, M. (1993)

Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.

15 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:776-783

Kyper, M. Harhangi, H.R., Stave, A.K., Winkler, A.A., Jetten, M.S., de Laat, W.T., den Ridder, J.J.J., Op den Camp, H.J., van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (2003)

High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?

20 *FEMS Yeast Res.* **4**:69-78

Maniatis T, Fritsch, E.F y Sambrook, J. (1982)

Molecular cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York.

Metzger, M.H. y Hollenberg, C.P. (1994)

25 Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* transformant.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**:319-325

Moes, J.M., Pretorius, I.S. y van Zyl, W.H. (1996)

30 Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*

Biotechnol. Lett. **18**: 269-274.

Rawat, U., Phadthare, S., Deshpande, V. y Rao, M. (1996)

A novel xylose isomerase from *Neurospora crassa*.

Biotechnol. Lett. **18**:1267-1270

35 **Sarthy AV, McConaughy BL, Lobo Z, Sundstrom JA, Furlong CE, Hall BD,**

Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*.

Appl Environ Microbiol. sep.1987; 53(9):1996-2000

Schaaff-Gerstenschläger, I. y Miosga, T. (1997)

The pentose phosphate pathway. En: *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications*. Zimmermann, F.K. und Entian K.-D (Ed.), Capítulo 15. Technomic, Lancaster, PA

5 **Taxis, C. y Knop, M. (2006)**

System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*.

BioTechniques **40**, No. 1

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

10 Pentose metabolism in *Candida utilis* Parte I: Xylose isomerase.

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

Vongsuvanglert, V. y Tani, Y. (1988)

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

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

Yamanaka, K. (1969)

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

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

Zimmermann, F. K. (1975)

20 Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Mutation Res. **31**:71-81.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
<120> Xilosa-isomerasa procariótica para la construcción de levaduras fermentadoras de xilosa
5 <130> U30216PCT
<150> DE 10 2008 031 350.5
<151> 02-07-2008
<160> 3
<170> PatentIn version 3.3
10 <210> 1
<211> 438
<212> PRT
<213> Clostridium phytofermentans
<400> 1
15

ES 2 563 638 T3

Met Lys Asn Tyr Phe Pro Asn Val Pro Glu Val Lys Tyr Glu Gly Pro
 1 5 10 15

Asn Ser Thr Asn Pro Phe Ala Phe Lys Tyr Tyr Asp Ala Asn Lys Val
 20 25 30

Val Ala Gly Lys Thr Met Lys Glu His Cys Arg Phe Ala Leu Ser Trp
 35 40 45

Trp His Thr Leu Cys Ala Gly Gly Ala Asp Pro Phe Gly Val Thr Thr
 50 55 60

Met Asp Arg Thr Tyr Gly Asn Ile Thr Asp Pro Met Glu Leu Ala Lys
 65 70 75 80

Ala Lys Val Asp Ala Gly Phe Glu Leu Met Thr Lys Leu Gly Ile Glu
 85 90 95

Phe Phe Cys Phe His Asp Ala Asp Ile Ala Pro Glu Gly Asp Thr Phe
 100 105 110

Glu Glu Ser Lys Lys Asn Leu Phe Glu Ile Val Asp Tyr Ile Lys Glu
 115 120 125

Lys Met Asp Gln Thr Gly Ile Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala Asn Asn
 130 135 140

Phe Ser His Pro Arg Phe Met His Gly Ala Ser Thr Ser Cys Asn Ala
 145 150 155 160

ES 2 563 638 T3

Asp Val Phe Ala Tyr Ala Ala Ala Lys Ile Lys Asn Ala Leu Asp Ala
165 170 175

Thr Ile Lys Leu Gly Gly Lys Gly Tyr Val Phe Trp Gly Gly Arg Glu
180 185 190

Gly Tyr Glu Thr Leu Leu Asn Thr Asp Leu Gly Leu Glu Leu Asp Asn
195 200 205

Met Ala Arg Leu Met Lys Met Ala Val Glu Tyr Gly Arg Ala Asn Gly
210 215 220

Phe Asp Gly Asp Phe Tyr Ile Glu Pro Lys Pro Lys Glu Pro Thr Lys
225 230 235 240

His Gln Tyr Asp Phe Asp Thr Ala Thr Val Leu Ala Phe Leu Arg Lys
245 250 255

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

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

Asn Gly Ala Phe Gly Ser Val Asp Ala Asn Gln Gly Asp Pro Asn Leu
290 295 300

Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Thr Asp Val His Ser Ala Thr Leu
305 310 315 320

Ala Met Leu Glu Val Leu Lys Ala Gly Gly Phe Thr Asn Gly Gly Leu
325 330 335

Asn Phe Asp Ala Lys Val Arg Arg Gly Ser Phe Glu Phe Asp Asp Ile
340 345 350

Ala Tyr Gly Tyr Ile Ala Gly Met Asp Thr Phe Ala Leu Gly Leu Ile
355 360 365

Lys Ala Ala Glu Ile Ile Asp Asp Gly Arg Ile Ala Lys Phe Val Asp
370 375 380

Asp Arg Tyr Ala Ser Tyr Lys Thr Gly Ile Gly Lys Ala Ile Val Asp
385 390 395 400

Gly Thr Thr Ser Leu Glu Glu Leu Glu Gln Tyr Val Leu Thr His Ser
405 410 415

ES 2 563 638 T3

Glu Pro Val Met Gln Ser Gly Arg Gln Glu Val Leu Glu Thr Ile Val
 420 425 430

Asn Asn Ile Leu Phe Arg
 435

<210> 2

<211> 1317

5 <212> ADN

<213> Clostridium phytofermentans

<400> 2

```

atgaaaaatt actttccaaa tgttccagaa gtaaaatcag aaggcccaaa ttcaacgaat      60
ccatttgctt ttaaataatta tgacgcaa ataaagttgtag cgggtaaaac aatgaaagag      120
cactgtcgctt ttgcattatc ttgggtggcat actctttgtg caggtggtgc tgatccattc      180
ggtgtaacaa ctatggatag aacctacgga aatatcacag atccaatgga acttgctaag      240
gcaaaagttg acgctggttt cgaattaatg actaaattag gaattgaatt cttctgtttc      300
catgacgcag atattgctcc agaaggtgat acttttgaag agtcaaagaa gaatcttttt      360
gaaatcgctg attacatcaa agagaagatg gatcagactg gtatcaagtt attatgggggt      420
actgctaata actttagtca tccaagattt atgcatgggtg cttccacatc ttgcaacgca      480
gacgtatttg catatgctgc tgctaagatt aagaatgcat tagatgcaac aattaaatta      540
ggcggtaaag gttatgtatt ctgggggtggt cgtgaagggt atgaaacact tcttaataca      600
gatttaggac ttgagcttga taatatggct agacttatga agatggctgt agagtatggc      660
cgtgcaaatg gttttgatgg cgacttctat attgagccaa agccaaagga accaaccaag      720
catcaatatg attttgatac agcaaccgta cttgctttcc ttcgcaaata tggcttagaa      780
aaagatttca agatgaacat tgaagcaaac catgctactc ttgcaggtca tacctttgaa      840
catgaacttg caatggctag agttaatggt gcatttggtt ctgtagatgc aaaccaggggt      900
gatccaaacc ttggatggga tacggatcaa ttccaactg atgttcatag tgcaactctt      960
gcaatgcttg aagtacttaa ggctggtgga ttcactaacg gcggacttaa ctttgatgca     1020
aaggtaagac gtggttcctt cgaatttgat gatattgcat acggttatat tgcaggaatg     1080
gatacttttg cacttggttt aattaaggct gctgagatta tcgacgatgg tagaatcgca     1140
aaatttgtag atgatcgta tgcaagctat aaaacaggaa ttggtaaagc aatttgggat     1200
ggaactacat ctcttgaaga attagagcag tatgttttaa cacatagtga accagtaatg     1260
cagagtggtc gtcaggaagt tcttgaaaca atcgtaaata atattttatt tagataa     1317
    
```


ES 2 563 638 T3

<210> 3

<211> 1317

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos del marco de lectura abierto (ORF) de la xilosa-isomerasa de *C. phytofermentans* en una forma optimizada en codones

<400> 3

```

atgaagaact acttcccaaa cgttccagaa gttaagtacg aaggtccaaa ctctaccaac      60
ccattcgctt tcaagtacta cgacgctaac aaggttgttg ctggtaagac catgaaggaa      120
cactgtagat tcgctttgtc ttggtggcac accttgtgtg ctggtggtgc tgaccattc      180
ggtgttacca ccatggacag aacctacggt aacattaccg acccaatgga attggctaag      240
gctaaggttg acgctggttt cgaattgatg accaagttgg gtattgaatt cttctgtttc      300
cacgacgctg acattgctcc agaagggtgac accttcgaag aatctaagaa gaacttgttc      360
gaaattgttg actacattaa ggaaaagatg gaccaaaccg gtattaagtt gttgtggggg      420
accgctaaca acttctctca cccaagattc atgcacggtg cttctacctc ttgtaacgct      480
gacgttttcg cttacgctgc tgctaagatt aagaacgctt tggacgctac cattaagttg      540
ggtggtaagg gttacgtttt ctgggggtgt agagaagggt acgaaacctt gttgaacacc      600
gacttggggt tgggaattgga caacatggct agattgatga agatggctgt tgaatacgg      660
agagctaacg gtttcgacgg tgacttctac attgaaccaa agccaaagga accaaccaag      720
caccaatcag acttcgacac cgctaccggt ttggctttct tgagaaagta cggtttgga      780
aaggacttca agatgaacat tgaagctaac cacgctacct tggctggtca caccttcgaa      840
cacgaattgg ctatggctag agttaacggt gctttcgggt ctggtgacgc taaccaaggt      900
gacccaaact tgggttgga caccgaccaa tccaaccg acgttcactc tgctaccttg      960
gctatggttg aagttttgaa ggctgggtgt ttcaccaacg gtggtttgaa cttcgacgct     1020
aaggttagaa gaggttcttt cgaattcgac gacattgctt acggttacat tgctggtatg     1080
gacaccttcg ctttggggtt gattaaggct gctgaaatta ttgacgacgg tagaattgct     1140
aagttcgttg acgacagata cgcttcttac aagaccggtg ttggttaaggc tattggtgac     1200
ggtaccacct ctttgaaga attggaacaa tacgttttga cccactctga accagttatg     1260
caatctggta gacaagaagt tttggaacc attgttaaca acattttggt cagataa      1317

```

REIVINDICACIONES

1. Uso de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica y que es al menos un 95% idéntica, preferiblemente un 99% idéntica con la secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ ID NO. 2, o que es al menos un 95% idéntica, preferiblemente un 99% idéntica con la secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ ID NO. 3, para la transformación de una célula, para la expresión recombinante y la preparación de la xilosa-isomerasa y/o para la conversión de xilosa en xilulosa por parte de la célula,
- 5 en donde la xilosa-isomerasa (XI) procede de *Clostridium phytofermentans* y comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica, preferiblemente un 99% idéntica con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO. 1.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, para
- la conversión y/o metabolización de biomaterial con contenido en xilosa,
 - la preparación de compuestos químicos de origen biológico,
 - la preparación de biobutanol y/o de bioetanol.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO. 3, que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica, comprende una secuencia de ácidos nucleicos que está optimizada en codones para uso en una célula huésped.
- 20 4. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula de ácido nucleico es una construcción de expresión de ácidos nucleicos que comprende secuencias de promotor y terminador, en donde el promotor está unido operativamente con la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI), en donde preferiblemente la construcción de expresión de ácidos nucleicos comprende, además, secuencias de reconocimiento 5' y/o 3' y/o marcadores de selección.
- 25 5. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la célula es una célula de levadura o una célula de hifomiceto, en donde preferiblemente la célula de levadura es un miembro de un gen elegido del grupo de *Saccharomyces*, *Kuyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, *Arxula* y *Yarrowia*, preferiblemente es un miembro de una especie elegida del grupo de *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *K. fragilis*, en donde de manera particularmente preferida la célula del hongo hifomiceto es un miembro de un gen elegido del grupo de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* y *Penicillium*.
- 30 6. Célula que está transformada con una construcción de expresión de ácidos nucleicos que comprende:
- (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una xilosa-isomerasa (XI) procariótica, en donde la xilosa-isomerasa (XI) procede de *Clostridium phytofermentans* y comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica, preferiblemente un 99% idéntica con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO. 1,
 - (b) un promotor unido operativamente con la secuencia de ácidos nucleicos que posibilita la expresión de la xilosa-isomerasa (XI) en la célula,
- 35 en donde la expresión de la construcción de expresión de ácidos nucleicos confiere a la célula la capacidad de isomerizar xilosa directamente en xilulosa,
- en donde la célula es una célula eucariótica, y en donde la célula está transformada con una molécula de ácidos nucleicos tal como se define en las reivindicaciones 1 a 5.
- 40 7. Célula según la reivindicación 6, en donde la célula es una célula de levadura o una célula de un hifomiceto, en donde preferiblemente la célula de levadura es un miembro de un gen elegido del grupo de *Saccharomyces*, *Kuyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, *Arxula* y *Yarrowia*,
- 45 y preferiblemente es un miembro de una especie elegida del grupo de *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *K. fragilis*, y en donde de manera particularmente preferida la célula del hongo hifomiceto es un miembro de un gen elegido del grupo de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* y *Penicillium*.

8. Célula según una de las reivindicaciones 6 a 7, que está transformada de manera transitoria o estable con la construcción de expresión de ácidos nucleicos o la molécula de ácidos nucleicos tal como se definen en las reivindicaciones 1 a 5.
- 5 9. Célula según una de las reivindicaciones 6 a 8, que expresa, además, una o varias enzimas que confieren a la célula la capacidad de producir otros productos de metabolización,
- 10 en donde los otros productos de metabolización se eligen preferiblemente del grupo de los compuestos químicos de origen biológico tales como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides o la molécula precursora amorfadieno del principio activo anti-malaria artemisinina.
- 10 10. Uso de una célula según una de las reivindicaciones 6 a 8, para la conversión y metabolización, en particular fermentación, de biomaterial con contenido en xilosa y/o la preparación de bioetanol.
11. Uso de una célula según una de las reivindicaciones 6 a 9, para la conversión y metabolización, en particular fermentación, de biomaterial con contenido en xilosa y/o la producción de un producto de metabolización,
- 15 en donde el producto de metabolización se elige preferiblemente del grupo de los compuestos químicos de origen biológico tales como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides o la molécula precursora amorfadieno del principio activo anti-malaria artemisinina.
12. Procedimiento para la producción de bioetanol, que comprende las etapas:
- 20 (a) reacción de un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula según una de las reivindicaciones 6 a 8, que convierte xilosa en etanol,
- (b) opcionalmente, obtención del etanol, en donde preferiblemente el medio contiene otra fuente de carbono, en particular glucosa.
- 25 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la producción de bioetanol tiene lugar con una tasa de al menos 0,03 g de etanol por g de peso en seco de levadura y hora.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 13, en el que el rendimiento en etanol es de al menos 0,3 g de etanol por g de xilosa.
15. Procedimiento para la producción de un producto de metabolización, que comprende las etapas:
- 30 (a) reacción de un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula según la reivindicación 9 que convierte xilosa con el fin de producir el producto de metabolización,
- (b) opcionalmente, obtención del producto de metabolización,
- 35 en donde el producto de metabolización se elige preferiblemente del grupo de los compuestos químicos de origen biológico tales como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes, aminoácidos, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina, alcanos, terpenos, isoprenoides o la molécula precursora amorfadieno del principio activo anti-malaria artemisinina, en donde preferiblemente el medio contiene otra fuente de carbono, en particular glucosa.

Figura 1

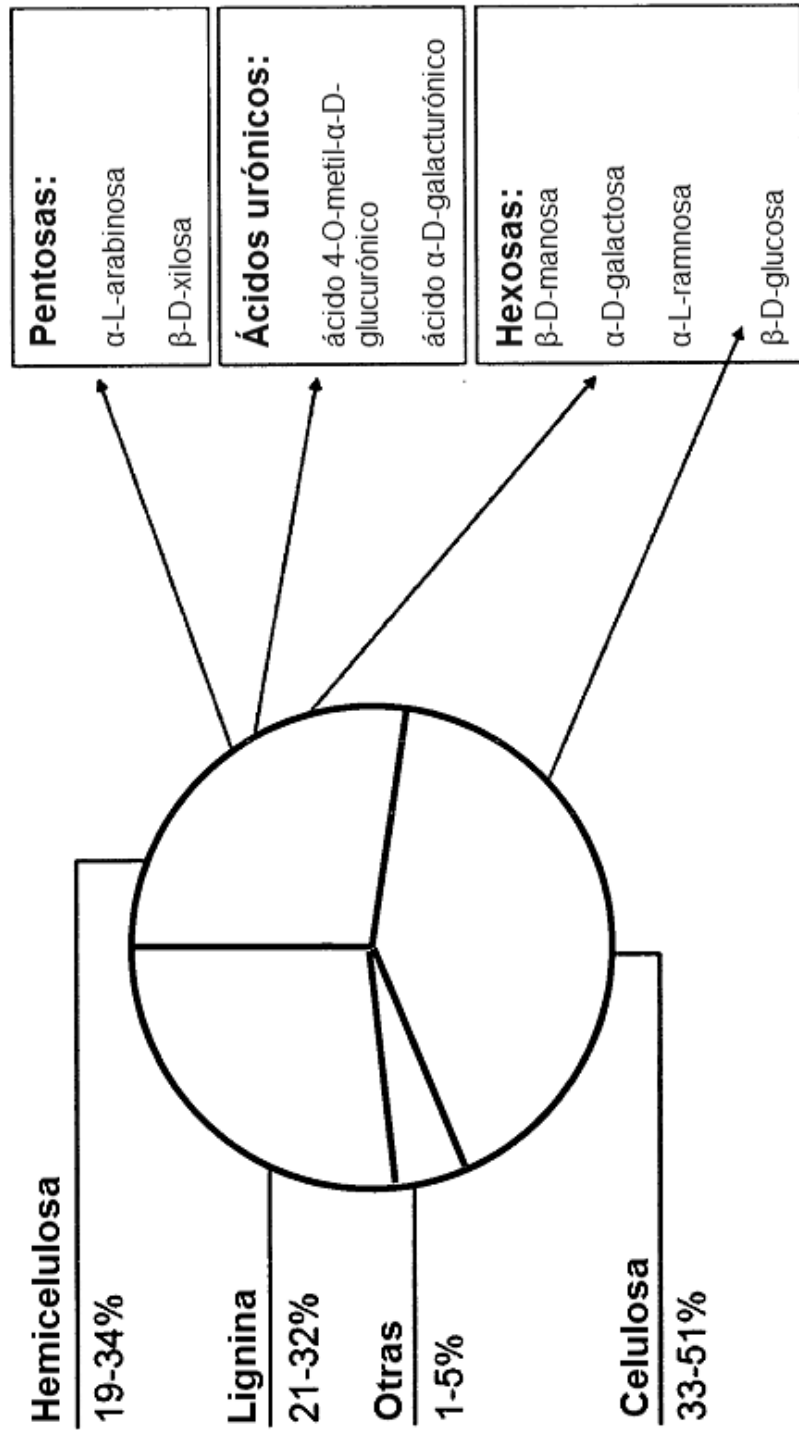


Figura 2

Conversión de xilosa por isomerización directa

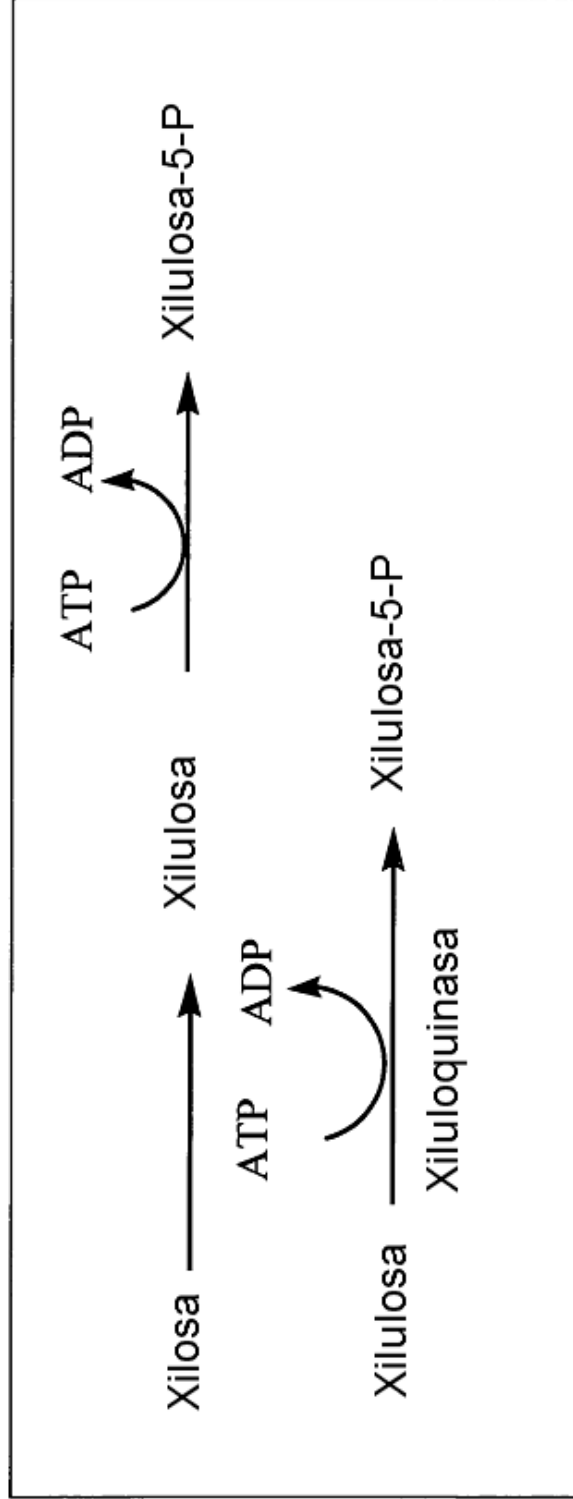
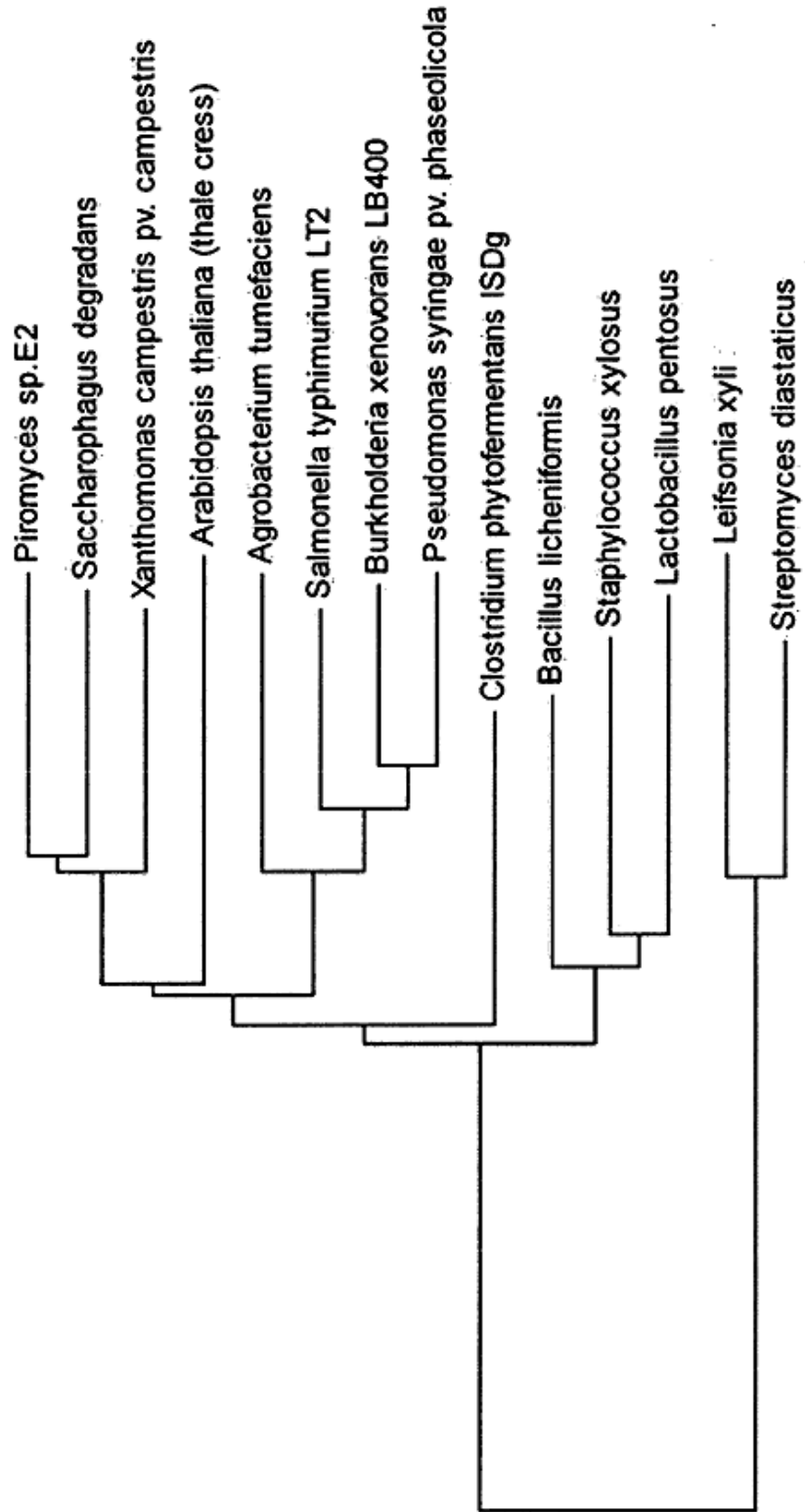


Figura 3



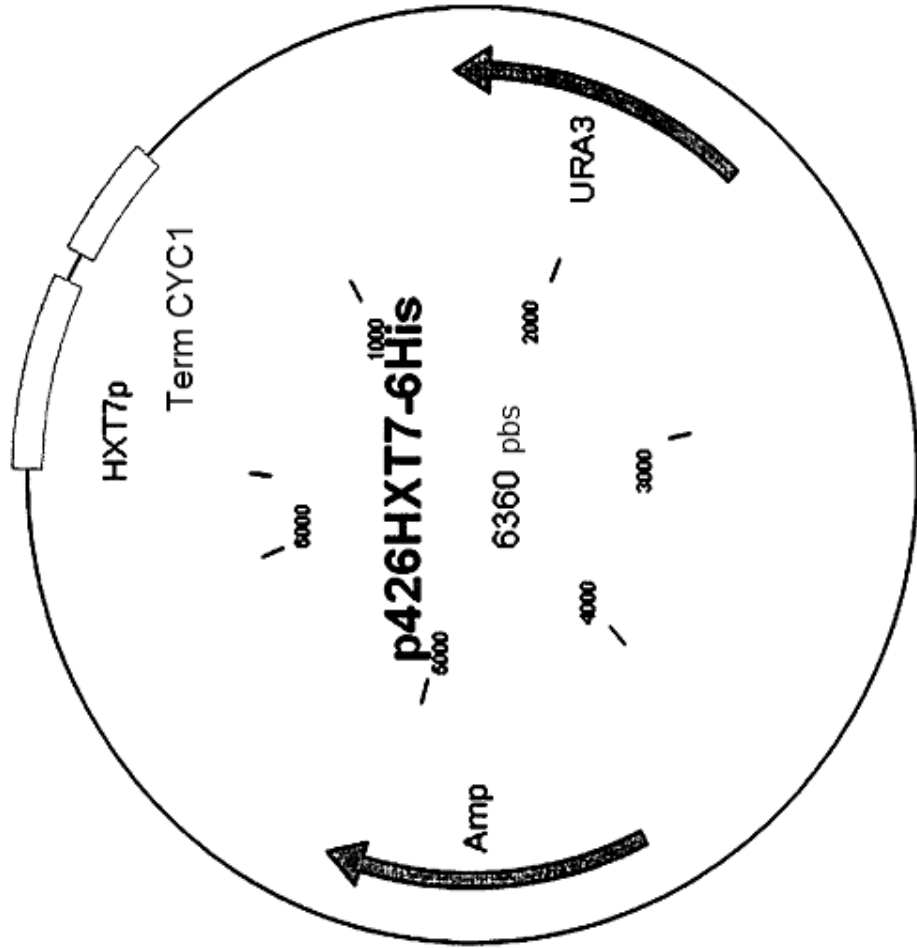


Figura 4 A

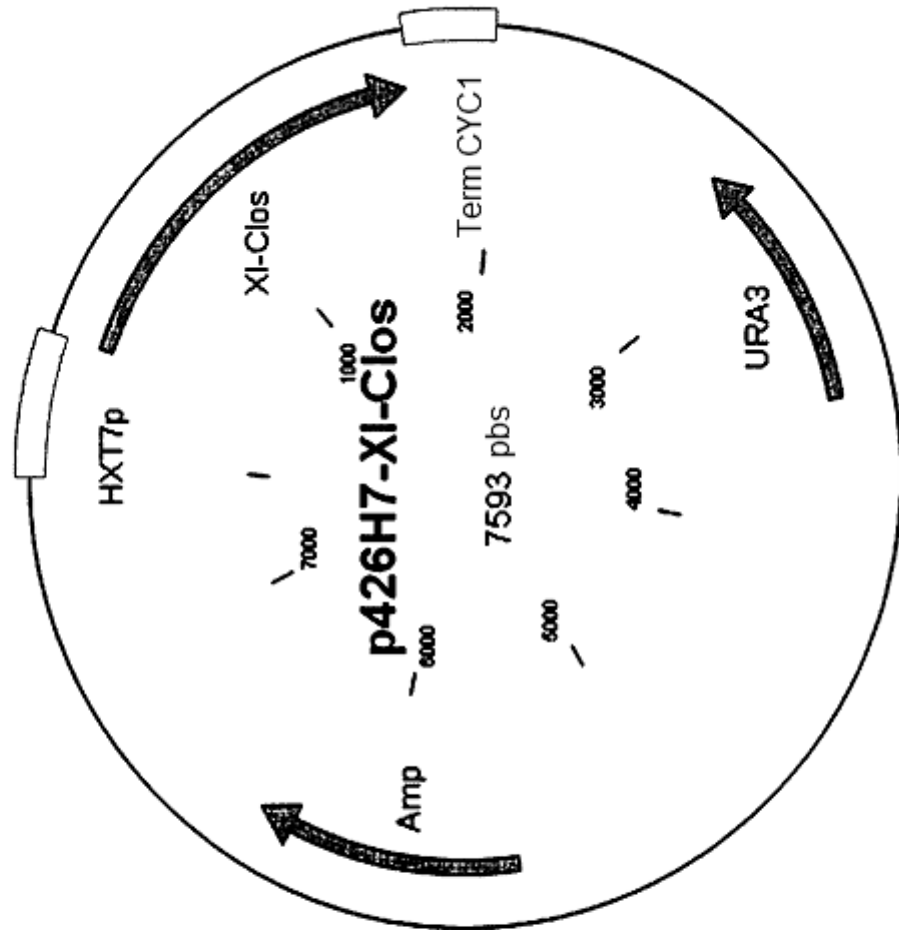


Figura 4 B

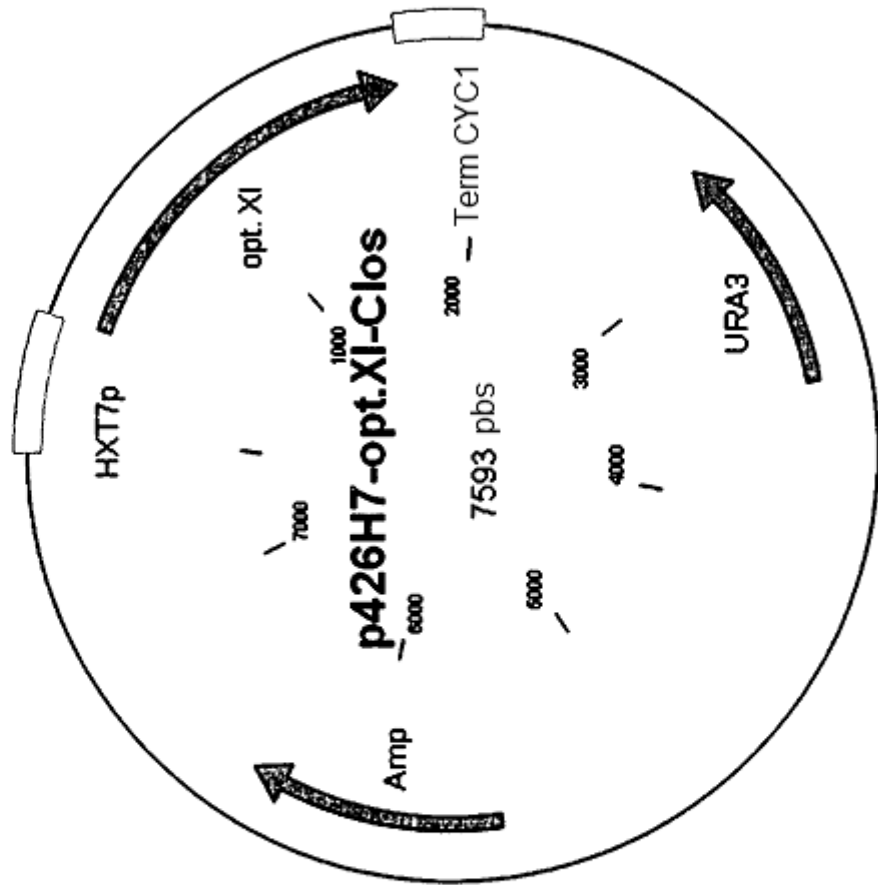


Figura 4 C

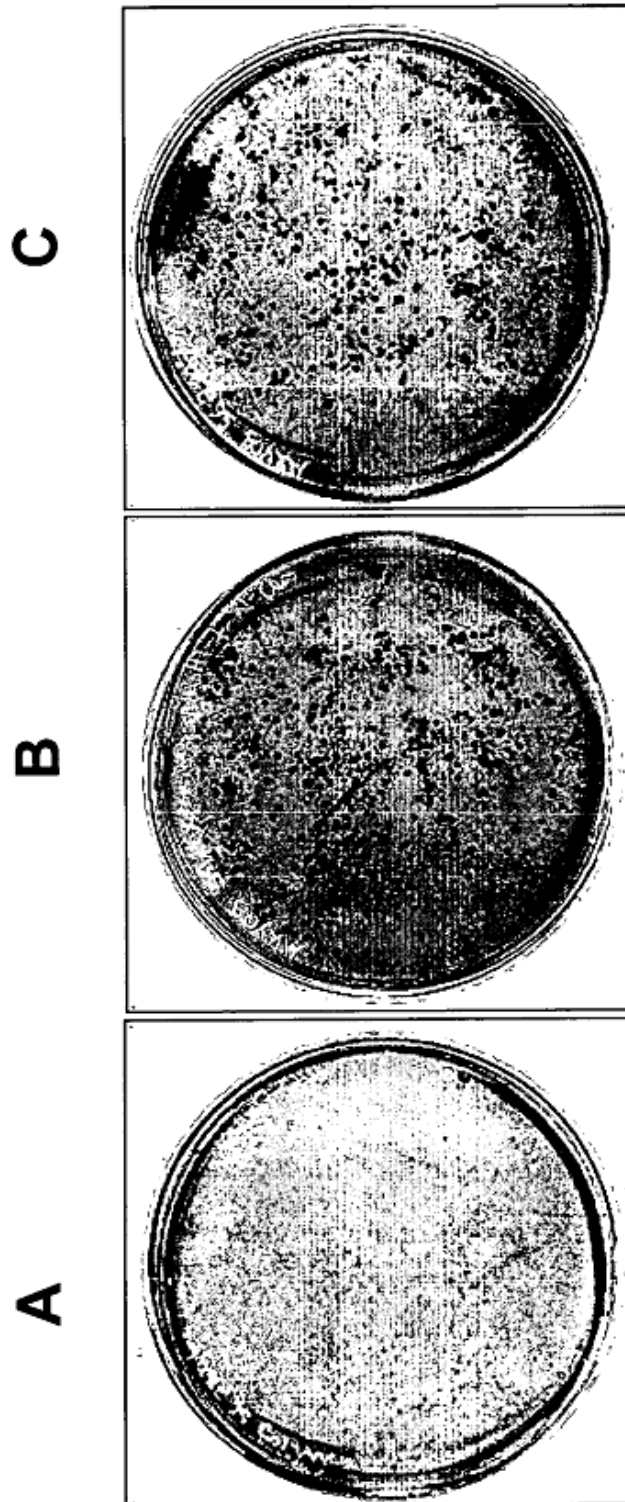


Figura 5

Figura 6

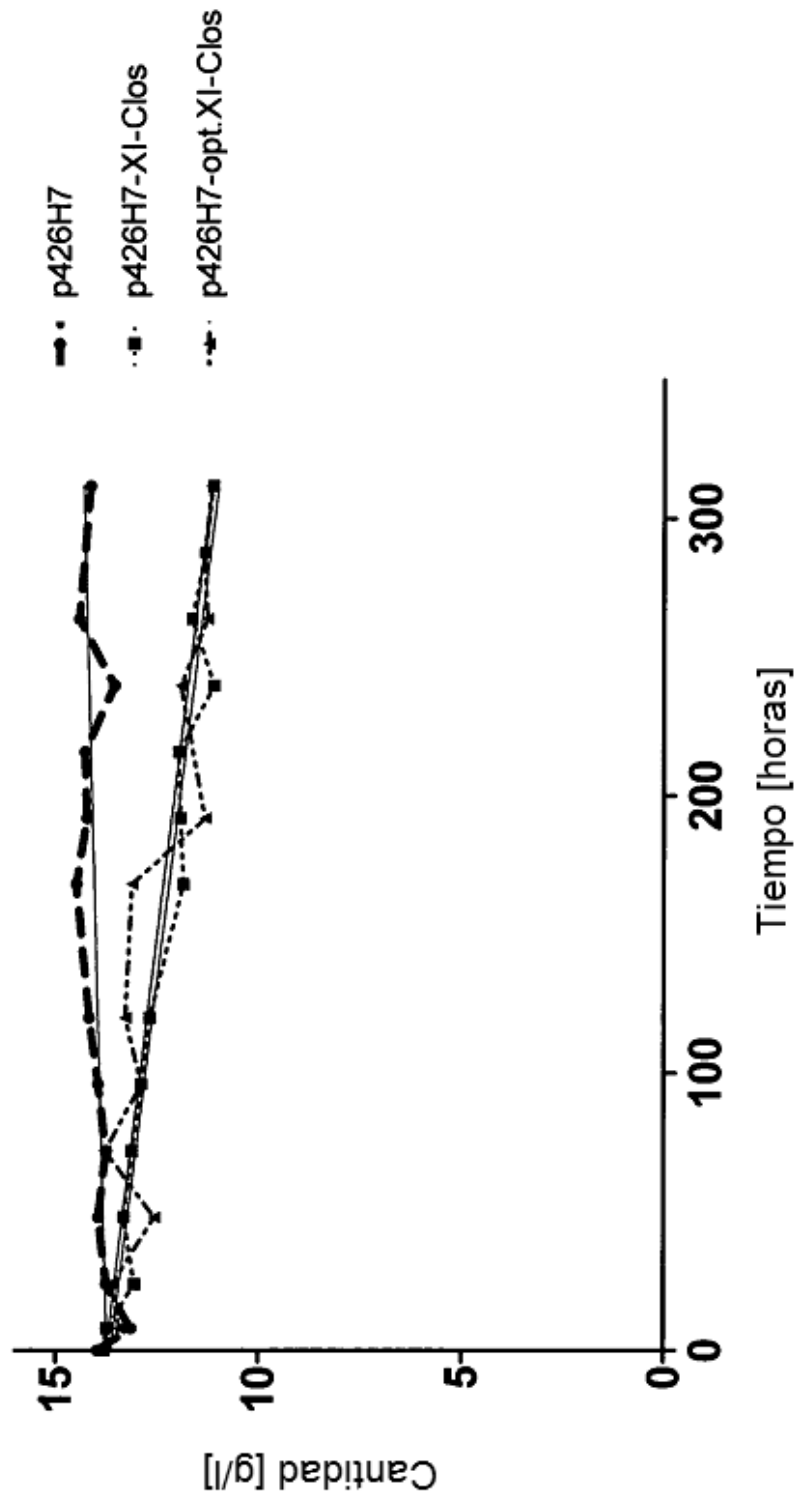


Figura 7

