

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 836**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/92** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

**C12R 1/865** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2009 PCT/IB2009/052916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2010 WO10001363**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2009 E 09773023 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2310499**

54 Título: **Microorganismo que expresa aldosa-1-epimerasa**

30 Prioridad:

**04.07.2008 GB 0812318**  
**17.07.2008 US 81535 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.10.2016**

73 Titular/es:

**TERRANOL A/S (100.0%)**  
**Building 223 Søtofts Plads**  
**2800 Lyngby, DK**

72 Inventor/es:

**SIBBESEN, OLE;**  
**RØNNOW, BIRGITTE y**  
**ANDERSEN, THOMAS HVID**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 587 836 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**

Microorganismo que expresa aldosa-1-epimerasa

Campo

La presente descripción se refiere a un microorganismo.

5 En particular, la presente descripción se refiere a un microorganismo transformado capaz de: (i) convertir una aldopentosa a una cetopentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación; y/o (ii) una mayor velocidad de crecimiento en presencia de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación; y/o (iii) un mayor metabolismo de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación.

10 La presente descripción se refiere además a métodos para preparar microorganismos transformados capaces de: (i) producir un compuesto derivado de pentosa; y/o (ii) convertir una aldopentosa a una cetopentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación; y/o (iii) una mayor velocidad de crecimiento en presencia de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación; y/o (iv) un mayor metabolismo de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación; dichos métodos comprendiendo el paso de  
15 transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

Además, la presente descripción se refiere a inóculos y medios de cultivo que comprenden el microorganismo de conformidad con la presente invención, o un microorganismo preparado por un método de conformidad con la presente invención.

20 La presente descripción se refiere adicionalmente a métodos para producir biocombustible y/o un compuesto derivado de pentosa, que comprende cultivar un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de conformidad con la presente invención.

Además, la presente descripción se refiere a un biocombustible y/o un compuesto derivado de pentosa obtenido por un método de la presente invención.

25 Además, la presente descripción se refiere al uso de un microorganismo de conformidad con la presente invención o preparado por un método de la presente invención, para la producción de una cetopentosa y/o un biocombustible y/o un compuesto derivado de pentosa.

Antecedentes de la invención

30 Se están desarrollando biocombustibles, como una alternativa verde y sostenible para combustibles fósiles para transportación, calefacción y suministro de energía. El aumento de los precios del petróleo ha hecho que la producción de los biocombustibles sea económicamente factible, y finalmente la disponibilidad de los combustibles fósiles es limitada. Se considera generalmente que el bioetanol, un biocombustible, es mucho más neutro en CO<sub>2</sub> en comparación con el combustible de transportación basado en petróleo. Además, es posible usar bioetanol como un sustituto parcial, así como un sustituto de gasolina completo sin cambios drásticos a la tecnología de los motores.

35 Típicamente, se produce bioetanol por fermentación de azúcares derivados de materias primas agrícolas - tales como caña de azúcar, remolacha azucarera, maíz y cereales (tales como trigo y maíz) -, los cuales son materias vegetales ricas en almidón y ricas en azúcar (el resto de estas materias vegetales es referido como desecho agrícola). Sin embargo, un problema asociado con los procedimientos que usan estos materiales, es que usan lo que de otra manera se habría usado como materias primas para piensos y alimentos para humanos. Una consecuencia de esto es que  
40 existe una reducción en la cantidad de materias primas y piensos que están disponibles los cuales, a su vez, incrementan el precio del alimento.

De hecho, se ha predicho que incluso si el cultivo de maíz entero de los Estados Unidos se usara para la producción de etanol, no sería posible satisfacer la demanda futura en los Estados Unidos. Por ejemplo, en la primavera de 2008, el  
45 US Department for Agriculture estimó que, con base en la cantidad de suelo de los Estados Unidos sembrado con maíz, aproximadamente 12,000 millones de bushels de maíz se habrían cosechado en los Estados Unidos en 2008. Mediante el uso de técnicas disponibles actualmente en la materia, 2.8 galones de etanol es la producción promedio de 1 bushel de maíz. De esta manera, si la cosecha entera de maíz de los Estados Unidos en 2008 fue producida en etanol, se habrían producido 33,000 millones de galones de etanol. Sin embargo, de acuerdo con la estadística de la US Energy Information Administration, 142 mil millones de galones de gasolina se usaron como combustible para automóviles y  
50 camiones en 2007 en los Estados Unidos. Asumiendo que no existió disminución significativa en la demanda de gasolina en los Estados Unidos en 2008, entonces el suministro del sustituto de gasolina etanol a partir del maíz no podía haber satisfecho esta demanda.

De esta manera, la disponibilidad de fuentes de materias vegetales ricas en almidón y ricas en azúcar, es un factor limitativo de velocidad para la producción de biocombustibles.

55 El denominado material de desecho agrícola de, por ejemplo, caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo, soya, maíz y cereales (tales como trigo y maíz), comprende principalmente material lignocelulósico. El material lignocelulósico comprende principalmente largas cadenas de azúcar. En general, aproximadamente dos terceras partes de los

azúcares de estos azúcares de cadena larga son azúcares de hexosa (en particular glucosa), los cuales están principalmente en la forma de celulosa, y aproximadamente una tercera parte de los azúcares de estos azúcares de cadena larga son azúcares de pentosa (en particular xilosa y arabinosa), presentes principalmente en la forma de polímeros de arabinoxilano. Después de la hidrólisis de la celulosa, los azúcares de hexosa pueden ser fermentados por el método tradicional basado en levaduras. Sin embargo, la celulosa es una estructura fuerte que es muy resistente a la extracción y la hidrólisis enzimática. Los arabinoxilanos son comparativamente más fáciles de extraer e hidrolizar para liberar, principalmente, azúcares de pentosa; sin embargo, los azúcares liberados no pueden ser fermentados en etanol en concentración suficientemente alta por los microorganismos conocidos.

Dos obstáculos para la producción eficiente de etanol a partir de materia vegetal de desecho, son las dificultades asociadas con la despolimerización de la celulosa y la falta de organismos adecuados que puedan metabolizar, para producción a gran escala, azúcares de pentosa en etanol.

Teóricamente, una forma de obtener dicho organismo adecuado, es transferir la capacidad para metabolizar pentosas a partir de organismos naturales que metabolizan la pentosa en productores de etanol conocidos altamente eficientes. Esta ha sido la materia de mucho trabajo en varios grupos de investigación durante los últimos 15 a 20 años. Sin embargo, con las pentosas, no ha sido posible obtener velocidades metabólicas comparables a las velocidades obtenidas cuando se usa glucosa. Incrementar esta baja velocidad metabólica ha sido y es aún una materia de discusión e investigación en curso, y es aún un obstáculo principal para el uso de, por ejemplo, *S. cerevisiae* diseñada en la fermentación de etanol a partir de pentosas.

#### Enunciados de la invención

En forma sorprendente, se ha encontrado que modificando microorganismos que expresan y/o sobreexpresan una aldosa-1-epimerasa, se facilita una conversión más rápida de las aldopentosas en cetopentosas (cuando se comparan con los microorganismos equivalentes antes de la modificación). De esta manera, pueden obtenerse microorganismos que sean capaces de una conversión más rápida de azúcares de pentosa (de preferencia azúcares de aldopentosa) en un biocombustible (de preferencia un biocombustible que comprende etanol), cuando se comparan con los microorganismos equivalentes antes de la modificación, lo cual es particularmente ventajoso para la producción de biocombustible industrial a gran escala.

La xilulosa-5-fosfato es un intermediario (el cual puede derivarse de D-xilosa, L-arabinosa o incluso D-lixosa) que entra en la vía de la pentosa fosfato y es metabolizada adicionalmente en etanol bajo condiciones anaeróbicas. Una vía metabólica entera de xilosa en etanol, se muestra en la figura 4.

La ribulosa-5-fosfato es un intermediario (el cual puede derivarse de D-ribosa) que entra en la vía de la pentosa fosfato, y es metabolizada adicionalmente en etanol bajo condiciones anaeróbicas.

En un aspecto, la presente invención provee un microorganismo transformado capaz de convertir: (i) una aldopentosa a una cetopentosa, a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación; y/o (ii) una mayor velocidad de crecimiento en presencia de aldopentosa, que el microorganismo equivalente antes de la transformación;

en donde dicho microorganismo comprende un promotor heterólogo unido operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica una aldosa-1-epimerasa endógena y/o en donde dicho microorganismo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una aldosa-1-epimerasa exógena, posibilitando de este modo que el microorganismo sobreexpresé dicha aldosa-1-epimerasa; y,

dicho microorganismo comprende una o más secuencias polinucleotídicas exógenas que codifican uno o más polipéptidos implicados en la conversión de una aldopentosa a una cetopentosa, en donde dichos uno o más polipéptidos se seleccionan entre el grupo que consiste en (i) a (vii) a continuación:

(i) xilosa isomerasa;

(ii) arabinosa isomerasa;

(iii) D-lixosa isomerasa;

(iv) ribosa isomerasa;

(v) la combinación de xilosa reductasa y xilulosa reductasa;

(vi) la combinación de arabinosa reductasa, L-arabitol 4-deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa y D-xilulosa reductasa;

(vii) la combinación de D-lixosa reductasa y D-arabinitol deshidrogenasa;

y/o

dicho microorganismo comprende al menos un vector de expresión que codifica una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en ribulocinasa, ribulosa fosfato 4-epimerasa, xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa y cualquier otra enzima de la vía de pentosa fosfato; y/o

dicho microorganismo comprende un promotor heterólogo unido operablemente a una o más secuencias de nucleótidos que codifican una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa y cualquier otra enzima de la vía de

pentosa fosfato que hace que el microorganismo sobreexpresen las una o más enzimas cuando el microorganismo se compara con el microorganismo equivalente sin el promotor; y en donde dicho microorganismo es una levadura transformada.

5 En otro aspecto, la presente invención provee un inóculo que comprende un microorganismo de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un medio de cultivo que comprende un microorganismo de acuerdo con la presente invención.

10 La presente invención provee, en un aspecto adicional, un método para preparar un microorganismo transformado capaz de: (i) producir un compuesto derivado de pentosa; y/o (ii) convertir una aldopentosa en una cetopentosa a una velocidad mayor que el microorganismo equivalente antes de la transformación; y/o (iii) una mayor velocidad de crecimiento en presencia de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación;

15 comprendiendo dicho método la etapa de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica una aldosa-1-epimerasa y/o un promotor heterólogo que posibilita que el microorganismo sobreexpresen una aldosa-1-epimerasa endógena cuando el microorganismo se compara con el microorganismo equivalente sin el promotor,

en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa en un compuesto derivado de pentosa; y,

20 dicho microorganismo comprende una o más secuencias polinucleotídicas exógenas que codifican uno o más polipéptidos implicados en la conversión de una aldopentosa a una cetopentosa, en donde dichos uno o más polipéptidos se seleccionan entre el grupo que consiste en (i) a (vii) a continuación:

(i) xilosa isomerasa;

(ii) arabinosa isomerasa;

(iii) D-lixosa isomerasa;

(iv) ribosa isomerasa;

25 (v) la combinación de xilosa reductasa y xilulosa reductasa;

(vi) la combinación de arabinosa reductasa, L-arabitol 4 deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa y D-xilulosa reductasa;

(vii) la combinación de D-lixosa reductasa y D-arabinitol deshidrogenasa;

y/o

30 dicho microorganismo comprende al menos un vector de expresión que codifica una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en ribulocinasa, ribulosa fosfato 4-epimerasa, xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa y cualquier otra enzima de la vía de pentosa fosfato; y/o

35 dicho microorganismo comprende un promotor heterólogo unido operablemente a una o más secuencias de nucleótidos que codifican una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa y cualquier otra enzima de la vía de pentosa fosfato que hace que el microorganismo sobreexpresen las una o más enzimas cuando el microorganismo se compara con el microorganismo equivalente sin el promotor; y en donde dicho microorganismo es una levadura transformada.

40 La presente invención provee, en otro aspecto, un método para producir un compuesto derivado de pentosa, en donde dicho método comprende cultivar en un medio de cultivo un microorganismo de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para producir un biocombustible, en donde dicho método comprende la etapa de cultivar en un medio de cultivo un microorganismo de acuerdo con la presente invención.

45 La presente descripción provee, en otro aspecto, un método para preparar un microorganismo transformado capaz de producir una cetopentosa, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, y en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

50 La presente descripción provee, en otro aspecto, un método para preparar un microorganismo transformado capaz de producir un compuesto derivado de pentosa, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, y en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

55 La presente descripción provee, en otro aspecto, un método para preparar un microorganismo transformado capaz de producir un compuesto derivado de pentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, y en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

En otro aspecto, la presente descripción provee un método para preparar un microorganismo transformado capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la

transformación, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

5 En otro aspecto, la presente descripción provee un método para preparar un microorganismo transformado capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo de modo que la expresión de una aldosa-1-epimerasa sea sobreexpresada, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

10 Además, la presente descripción provee un método para preparar un microorganismo transformado capaz de una mayor velocidad de crecimiento en presencia de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

15 En otro aspecto, la presente descripción provee un método para preparar un microorganismo transformado capaz de una mayor velocidad de crecimiento en presencia de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo de modo que la expresión de una aldosa-1-epimerasa sea sobreexpresada, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

20 La presente descripción provee adicionalmente un método para preparar un microorganismo transformado capaz de un mayor metabolismo de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

25 En otro aspecto, la presente descripción provee un método para preparar un microorganismo transformado capaz de un mayor metabolismo de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo de modo que la expresión de una aldosa-1-epimerasa sea sobreexpresada, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

30 La presente descripción provee, en otro aspecto, un método para producir un compuesto derivado de pentosa, en donde dicho método comprende cultivar en un medio de cultivo un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de la presente invención.

En otro aspecto, la presente descripción provee un método para producir un compuesto derivado de pentosa, que comprende los pasos de:

35 (a) transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa; y

(b) cultivar el microorganismo transformado en un medio de cultivo.

La presente descripción provee, en otro aspecto, un método para producir una cetopentosa, en donde dicho método comprende cultivar en un medio de cultivo un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de la presente invención.

40 En otro aspecto, la presente descripción provee un método para producir una cetopentosa, que comprende los pasos de:

(a) transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa; y

(b) cultivar el microorganismo transformado en un medio de cultivo.

45 Las cetopentosas mencionadas en la presente pueden ser metabolizadas adicionalmente dentro de la célula, facilitando la producción de una gama de productos que incluyen, pero no están limitados a, etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, acetaldehído, ácido itacónico, cresol, ácido 3-hidroxiisovalérico, poli-3-hidroxiácido, ácido protocatecuico, pirocatecol, guayacol, veratrol, vanilina, ácido vanílico, alcohol vanilílico, ácido mucónico, ácido adípico, ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-metoxibenzoico, 4-aminobenzoato, 4-hidroxianilina, 4-metoxianilina, quinol, anisol, fenol, ácido antranílico, 3-hidroxiantranilato, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, 2-aminofenol, 1,4-ciclohexanodiona y aminoácidos aromáticos.

En otro aspecto, la presente descripción provee un método para producir un biocombustible, en donde dicho método comprende el paso de cultivar en un medio de cultivo, un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de conformidad con la presente invención.

55 En otro aspecto, la presente descripción provee un método para preparar un microorganismo transformado capaz de producir un biocombustible a una mayor velocidad en un medio de cultivo que el microorganismo equivalente antes de

la transformación, dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, de preferencia en un vector de expresión que codifica para la misma, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

5 En otro aspecto, la presente descripción provee un método para producir un biocombustible, que comprende los pasos de:

(a) transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, de preferencia en un vector de expresión que codifica para la misma, en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa; y

(b) cultivar el microorganismo transformado en un medio de cultivo que comprende aldopentosa.

10 En otro aspecto, la presente descripción provee un método para producir un biocombustible, en donde dicho método comprende el paso de cultivar un microorganismo en un medio de cultivo, en donde dicho microorganismo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa y en donde dicho microorganismo es capaz de expresar dicha aldosa-1-epimerasa; y en donde dicho microorganismo es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

15 En otro aspecto, la presente descripción provee un biocombustible obtenido u obtenible por un método de conformidad con la presente invención.

En otro aspecto, la presente descripción provee el uso de un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de la presente invención, para la producción de una cetopentosa.

20 En otro aspecto, la presente descripción provee el uso de un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de la presente invención, para la producción de un compuesto derivado de pentosa.

Además, la presente descripción provee el uso de un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de la presente invención, para la producción de un biocombustible.

25 En otro aspecto, la presente descripción provee el uso de un microorganismo para la producción de un biocombustible, en donde dicho microorganismo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa y en donde dicho microorganismo es capaz de expresar dicha aldosa-1-epimerasa, y en donde dicho microorganismo es capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa.

En otro aspecto, la presente descripción provee un inóculo que comprende un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de conformidad con la presente invención.

30 Además, la presente descripción provee un medio de cultivo que comprende un microorganismo de conformidad con la presente invención o un microorganismo preparado por un método de conformidad con la presente invención.

#### Algunas ventajas

En forma ventajosa, mediante el uso de los microorganismos de conformidad con la presente invención, pueden producirse biocombustibles (tales como etanol).

35 Otra ventaja es que mediante el uso de los microorganismos de conformidad con la presente invención, pueden producirse eficientemente biocombustibles (tales como etanol) usando azúcares de pentosa. Sin que se desee que sea limitado por la teoría, la modificación de microorganismos que expresan o sobreexpresan una aldosa-1-epimerasa, muestra un incremento en la velocidad de interconversión entre anómeros de aldopentosa y la conversión intracelular de aldopentosas a cetopentosas – en otras palabras, alivia una coacción limitativa de velocidad –, lo cual a su vez permite una producción más rápida y más eficiente de etanol por la vía de la pentosa fosfato en comparación con el microorganismo equivalente antes de la modificación.

40 En forma más ventajosa, mediante el uso de los microorganismos de conformidad con la presente invención, pueden producirse biocombustibles a partir de materiales de desecho tales como desechos agrícolas (incluyendo paja de cereales - tales como paja de trigo; pulpa de remolacha azucarera; bagazo de caña de azúcar; forrajes - tales como forrajes de sorgo, sojas o maíz; y troceados de madera). Con la presente invención, no hay necesidad (o hay necesidad reducida) de usar materiales (tales como extracto de caña de azúcar, extracto de remolacha azucarera, almidón de sorgo, almidón de maíz o almidón de trigo), los cuales se usarían de otra manera como una fuente de alimento para humanos y/o como un pienso para animales.

45 En forma más ventajosa, la presente invención provee microorganismos que son capaces de metabolizar, para producción a gran escala (tal como producción industrial), azúcares de pentosa (tales como azúcares de aldopentosa) en un biocombustible (tal como un biocombustible que comprende etanol).

En forma ventajosa, los microorganismos de conformidad con la presente invención permiten el uso óptimo de los azúcares liberados por la hidrólisis de material lignocelulósico por la fermentación de azúcares de pentosa.

55 La presente invención permite la producción de un biocombustible el cual es más neutro en CO<sub>2</sub>, en comparación con un combustible de transportación basado en petróleo. Con la presente invención, las emisiones de CO<sub>2</sub> serán bajas

(incluso menores) cuando se produce el biocombustible de conformidad con la presente invención, en comparación con la producción de un combustible de transportación típico basado en petróleo (combustibles fósiles).

En forma sorprendente, la presente invención muestra que la transformación de microorganismos que expresan aldosa-1-epimerasa, resulta en una velocidad de conversión incrementada de azúcares de pentosa a un biocombustible.

## 5 Figuras

Figura 1. Una representación esquemática de las vías metabólicas que detallan el metabolismo de las dos aldopentosas más abundantes, D-xilosa y L-arabinosa. Ambas aldopentosas son convertidas en una cetopentosa, y además en D-xilulosa 5-fosfato. Sin que se desee que sea limitado por la teoría, como se indica en la figura, un tipo de vía (tipo de aldosa reductasa) se encuentra en hongos, mientras que el otro tipo de vía (tipo isomerasa) se encuentra en bacterias. En el tipo de vía en hongos, las primeras enzimas pueden denominarse “D-xilosa reductasa” y “L-arabinosa reductasa”, pero con frecuencia la misma enzima puede reducir D-xilosa y L-arabinosa y puede ser adecuada entonces para ambas vías, y ser referida por el nombre menos específico de “aldosa reductasa”.

Figura 2. Sin que se desee que sea limitado por la teoría, la figura 2 muestra una representación esquemática del tipo de vías metabólicas en hongos y bacterias de algunas pentosas (D- y L-lixosa, D-ribosa) menos abundantes, detallando el metabolismo inicial hasta la entrada en la vía de la pentosa fosfato.

Figura 3. Una representación esquemática de la parte no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato (PPP).

Figura 4. Una representación esquemática de la vía de la pentosa fosfato (PPP). Aquí, la cetopentosa xilulosa-5-fosfato, la cual puede derivarse de D-xilosa o L-arabinosa, es metabolizada adicionalmente en etanol bajo condiciones anaeróbicas. XI es xilosa isomerasa y XK es xilulocinasa. Se muestra el ingreso neto de xilosa en el procedimiento, y el rendimiento neto de etanol a partir del procedimiento (procedimiento neto).

## Descripción detallada

Como se usa en la presente, la frase “un microorganismo transformado capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación”, abarca microorganismos transformados con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, tal como un vector de expresión que comprende dicha secuencia de nucleótidos, y microorganismos transformados que sobreexpresan la expresión de una aldosa-1-epimerasa (en otras palabras, que sobreexpresan una aldosa-1-epimerasa).

En una modalidad, el microorganismo ha sido transformado con una secuencia de nucleótidos que hace que el microorganismo sobreexpresen una aldosa-1-epimerasa. Por ejemplo, un promotor es insertado en el genoma de un microorganismo que permite que el microorganismo sobreexpresen una secuencia de nucleótidos endógena que codifica para una aldosa-1-epimerasa.

En otra modalidad, el microorganismo ha sido transformado con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa. Por ejemplo, el microorganismo es transformado con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa enlazada operablemente a una secuencia reguladora.

De preferencia, la secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa mencionada en la presente, está en un vector de expresión que codifica para la misma.

De preferencia, el vector de expresión mencionado en la presente comprende un promotor capaz de sobreexpresar la secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa. Ejemplos de dichos promotores incluyen el promotor de GPD, el promotor de TEF y el promotor de ADP. Promotores preferidos que pueden usarse para sobreexpresar una aldosa-1-epimerasa, pueden ser cualquiera de los elementos reguladores que controlan la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas implicadas en la glucólisis y la fermentación de la glucosa.

Como se usa en la presente, el término “mayor velocidad” en la frase “un microorganismo transformado capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación), se refiere a un microorganismo transformado que es capaz de disminuir la cantidad de aldopentosa en un medio de cultivo, de modo que la reducción en la cantidad de aldopentosa en el medio de cultivo sea por lo menos 5%, 10%, 20% o 25% mayor por célula, que la del microorganismo equivalente antes de la transformación cuando se cultiva bajo las mismas condiciones de cultivo por un período dado dentro de la fase de crecimiento exponencial.

El término “fase de crecimiento exponencial” se usa en el sentido normal de la técnica – por ejemplo, los microorganismos están dividiéndose a una velocidad constante, de modo que el número total de microorganismos se duplica con cada división. El experto en la técnica puede determinar fácilmente la fase de latencia (el período durante el cual las células se ajustan a un nuevo ambiente antes del inicio del crecimiento exponencial), la fase de crecimiento exponencial, la fase estacionaria (en donde la velocidad de división de la célula iguala a la velocidad de muerte de la célula, y por lo tanto el número de células viables se mantiene constante) y la fase de muerte (en donde el conteo de células viables disminuye), para cualquier microorganismo para una serie dada de condiciones de cultivo.

El término “microorganismo equivalente antes de la transformación”, como se usa en la presente, se refiere al microorganismo antes de la transformación con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-

epimerasa, o antes de la transformación con una secuencia de nucleótidos que causa la sobreexpresión (por ejemplo, sobreexpresión) de una aldosa-1-epimerasa.

Como se usa en la presente, el término “la conversión de una aldopentosa a una cetopentosa” se refiere a, por ejemplo, la conversión de la aldopentosa xilosa a la cetopentosa xilulosa; la conversión de la aldopentosa arabinosa a la cetopentosa xilulosa; la conversión de la aldopentosa arabinosa a la cetopentosa ribulosa; la conversión de la aldopentosa lixosa a la cetopentosa xilulosa; y la conversión de la aldopentosa ribosa a la cetopentosa ribulosa.

En un aspecto preferido, la cetopentosa es xilulosa.

El término “un microorganismo transformado capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa”, como se usa en la presente, se refiere a un microorganismo que comprende una o más secuencias de polinucleótidos que codifican para uno o más polipéptidos implicados en la conversión de una aldopentosa a una cetopentosa. Ejemplos de polipéptidos capaces de convertir una aldopentosa a una cetopentosa, incluyen xilosa isomerasa, arabinosa isomerasa, D-lixosa isomerasa y ribosa isomerasa; la combinación de xilosa reductasa y xilulosa reductasa, la combinación de arabinosa reductasa, L-arabitol 4-deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa y D-xilulosa reductasa, y la combinación de D-lixosa reductasa y D-arabinitol deshidrogenasa. Los polipéptidos pueden ser endógenos y/o exógenos a dicho microorganismo. Los polipéptidos pueden ser codificados por uno o más vectores de expresión.

De preferencia, la aldopentosa se selecciona del grupo que consiste de xilosa, arabinosa, ribosa y lixosa. De preferencia, la aldopentosa es xilosa o arabinosa. Más preferiblemente, la aldopentosa es xilosa.

La conversión espontánea entre  $\alpha$ -aldopentosa y  $\beta$ -aldopentosa en microorganismos, es lenta. Por ejemplo, la conversión espontánea de  $\beta$ -D-xilosa a  $\alpha$ -D-xilosa tiene un valor K de primer orden de aproximadamente 0.094/min a temperatura fisiológica (Bailey *et al.*, 1969).

Como se usa en la presente, el término “sobreexpresa” en la frase “una secuencia de nucleótidos que hace que el microorganismo sobreexpresa una aldosa-1-epimerasa” y “un promotor capaz de sobreexpresar la secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa”, se refiere a un incremento en la expresión de cero a un nivel de expresión, o que va de un menor nivel de expresión a un mayor nivel de expresión (por ejemplo, sobreexpresión), cuando el microorganismo transformado se compara con el microorganismo equivalente antes de la transformación. Los microorganismos que sobreexpresan una aldosa-1-epimerasa, tienen una capacidad incrementada de catalizar la conversión entre  $\alpha$ -aldopentosa y  $\beta$ -aldopentosa.

De preferencia, dicho microorganismo transformado que sobreexpresa una aldosa-1-epimerasa es capaz de catalizar la conversión de una  $\alpha$ -aldopentosa a una  $\beta$ -aldopentosa a una velocidad que es por lo menos 10%, 15%, 20% o 25% mayor que en un microorganismo no transformado, medida en una prueba en donde 1 g de masa de células disueltas se ha añadido a 50 ml de una solución neutra regulada en su pH recién preparada que contiene 100 mM de la  $\beta$ -aldopentosa, usando la prueba de interconversión como se describe más adelante en la presente.

Ejemplos de microorganismos que sobreexpresan una aldosa-1-epimerasa, incluyen: (i) microorganismos transformados con un vector de expresión que codifica para una aldosa-1-epimerasa (antes de la transformación, dicho microorganismo no era capaz de expresar la aldosa-1-epimerasa); y (ii) microorganismos transformados que sobreexpresan la expresión de una aldosa-1-epimerasa endógena (antes de la transformación, dicho microorganismo era capaz de expresar dicha aldosa-1-epimerasa para una serie dada de condiciones de cultivo durante el crecimiento exponencial, pero después de la transformación, dicho microorganismo es capaz de expresar dicha aldosa-1-epimerasa a un mayor nivel, en las mismas condiciones de cultivo, durante el crecimiento exponencial).

Como se usa en la presente, el término “mayor velocidad de crecimiento” en la frase “un microorganismo transformado capaz de una mayor velocidad de crecimiento en presencia de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación”, se refiere a un microorganismo transformado que es capaz de una velocidad de crecimiento incrementada, de modo que el tiempo transcurrido para una duplicación en el número de microorganismos por ml durante la fase de crecimiento exponencial, es por lo menos 10%, 15%, 20% o 25% menor, que el del microorganismo equivalente antes de la transformación cuando se cultiva bajo las mismas condiciones de cultivo. En un aspecto preferido, los microorganismos se cultivan a su temperatura de crecimiento óptima; y de preferencia, el medio de cultivo comprende entre 1% y 4% de aldopentosa además de cantidades óptimas de sales, vitaminas y otros nutrientes necesarios para el microorganismo.

El término “mayor metabolismo”, como se usa en la presente en la frase “un microorganismo transformado capaz de un mayor metabolismo de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación”, se refiere a un microorganismo transformado que es capaz de metabolizar la aldopentosa, de modo que la cantidad consumida de la aldopentosa en el medio de cultivo es por lo menos 10%, 20%, 25%, 30% o 35% mayor por célula, que la del microorganismo equivalente antes de la transformación cuando se cultiva bajo las mismas condiciones de cultivo por un periodo dado dentro de la fase de crecimiento exponencial. En un aspecto preferido, los microorganismos se cultivan a su temperatura de crecimiento óptima; y de preferencia, el medio de cultivo comprende entre 1% y 4% de aldopentosa además de cantidades óptimas de sales, vitaminas y otros nutrientes necesarios para el microorganismo.

De preferencia, el microorganismo transformado de conformidad con la presente invención tiene una velocidad de conversión de la aldopentosa a la cetopentosa que está a un mayor nivel que la del microorganismo equivalente antes de la transformación. El término “mayor nivel”, como se usa en esta frase, se refiere a un microorganismo transformado

que es capaz de convertir aldopentosa, de modo que la reducción en la cantidad de aldopentosa en el medio de cultivo es por lo menos 5%, 10%, 20% o 25% mayor por célula, que la del microorganismo equivalente antes de la transformación cuando se cultiva bajo las mismas condiciones de cultivo por un período dado dentro de la fase de crecimiento exponencial.

5 El término “una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa”, como se usa en la presente, abarca secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias reguladoras que permiten la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa, tales como promotores e intensificadores que pueden estar asociados nativamente o no nativamente con la secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa.

10 Como se usa en la presente, el término “mayor velocidad” en la frase “un microorganismo transformado capaz de producir un biocombustible a una mayor velocidad en un medio de cultivo que el microorganismo equivalente antes de la transformación”, se refiere a un microorganismo transformado capaz de producir por lo menos 10%, 20%, 25%, 30% o 35% más biocombustible por célula, que la del microorganismo equivalente antes de la transformación cuando se cultiva bajo las mismas condiciones de cultivo por un período dado dentro de la fase de crecimiento exponencial. De preferencia, los microorganismos se cultivan en sus circunstancias de producción óptimas (por ejemplo, presión de oxígeno y velocidad de agitación óptimas), y de preferencia el medio de cultivo comprende entre 2% y 6% de aldopentosa además de cantidades óptimas de sales, vitaminas y otros nutrientes necesarios para el microorganismo.

De preferencia, el método para producir un biocombustible, comprende además el paso de obtener el biocombustible a partir del medio de cultivo.

#### Microorganismo transformado

20 Como se menciona en la presente, el término “microorganismo transformado” se refiere a un microorganismo que ha sido genéticamente alterado por tecnología de ADN recombinante. El término “transformado”, como se usa en la presente, es sinónimo de términos tales como “transfectado”, “recombinante”, “genéticamente diseñado” y “genéticamente modificado”.

25 El término “microorganismo transformado” con relación a la presente invención, incluye cualquier microorganismo que comprende uno o varios vectores de expresión que comprenden la secuencia o secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente, y/o uno o varios promotores que son capaces de permitir la expresión (en particular la sobreexpresión, es decir, sobreexpresión) de la secuencia o secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente. En una modalidad, la secuencia o secuencias de nucleótidos son incorporadas en el genoma del microorganismo. En otra modalidad, el promotor es incorporado en el genoma del microorganismo. Estas características permiten que el microorganismo transformado (cuando se compara con el microorganismo equivalente antes de la transformación), (i) metabolice azúcares de aldopentosa a una mayor velocidad; y/o (ii) tenga una mayor velocidad de crecimiento; y/o (iii) produzca cetopentosa a una mayor velocidad; y/o (iv) produzca un compuesto derivado de pentosa a una mayor velocidad; y/o (v) produzca un biocombustible a una mayor velocidad.

35 El término “microorganismo transformado” no abarca secuencias codificantes de nucleótidos nativas en su ambiente natural cuando están bajo el control de su promotor nativo, el cual está también en su ambiente natural.

40 Por lo tanto, el microorganismo transformado de la presente invención incluye un microorganismo que comprende cualquiera de, o combinaciones de, las secuencias de nucleótidos que codifican para las enzimas mencionadas en la presente, construcciones que comprenden dichas secuencias de nucleótidos, vectores que comprenden dichas secuencias de nucleótidos, plásmidos que comprenden dichas secuencias de nucleótidos y vectores de expresión que comprenden dichas secuencias de nucleótidos.

De esta manera, otra modalidad de la presente invención provee microorganismos transformados o transfectados con una o varias secuencias de nucleótidos que expresan la secuencia o enzimas mencionadas en la presente. El microorganismo se seleccionará para que sea compatible con el vector y puede ser, por ejemplo, células de bacterias, hongos o levaduras.

45 Ejemplos de organismos hospederos bacterianos adecuados, son especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

50 Dependiendo de la naturaleza de la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican para la enzima o enzimas mencionadas en la presente, pueden preferirse hospederos eucarióticos tales como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura sobre las células de otros hongos debido a que son más fáciles de manipular.

El uso de microorganismos adecuados – tales como células hospederas de hongos y levaduras – puede proveer modificaciones post-traducción (por ejemplo, miristoilación, glucosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina), ya que pueden ser necesarios para conferir actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinantes mencionados en la presente.

55 Microorganismos adecuados incluyen bacterias, hongos y levaduras. De preferencia, el microorganismo es una levadura o una bacteria.

De preferencia, dicho microorganismo transformado es una levadura transformada. De preferencia, dicha levadura transformada se deriva del género *Saccharomyces*. Más preferiblemente, dicha levadura transformada es *Saccharomyces cerevisiae*.

5 En otra modalidad, de preferencia, dicho microorganismo transformado es una bacteria transformada. De preferencia, dicha bacteria transformada se deriva del género *Zymomonas* o el género *Zymobacter*. Más preferiblemente, dicha bacteria transformada es *Zymomonas mobilis* o *Zymobacter palmae*.

En una modalidad, el microorganismo transformado descrito en la presente metaboliza azúcares de aldopentosa a una mayor velocidad cuando se cultiva en un medio de cultivo que comprende aldopentosa, que el microorganismo equivalente antes de la transformación.

10 En otro aspecto, la velocidad de crecimiento del microorganismo transformado descrito en la presente es mayor cuando se cultiva en un medio de cultivo que comprende aldopentosa, que el microorganismo equivalente antes de la transformación.

15 En otro aspecto, el microorganismo transformado mencionado en la presente es capaz de producir la cetopentosa a una mayor velocidad cuando se cultiva en un medio de cultivo que comprende aldopentosa, que el microorganismo equivalente antes de la transformación.

En otro aspecto, el microorganismo transformado mencionado en la presente es capaz de producir un biocombustible a una mayor velocidad cuando se cultiva en medio de cultivo que comprende aldopentosa, que el microorganismo equivalente antes de la transformación.

20 El microorganismo puede ser transformado usando técnicas que son de rutina en la materia, tales como electroporación (Sambrook *et al.*, 1989). Además, la presencia de una secuencia en un microorganismo transformado puede ser determinada por la selección del crecimiento en medios adecuados que seleccionan para el crecimiento del microorganismo transformado. En forma alternativa o además, la presencia de secuencias de ADN heterólogas insertadas puede determinarse por la PCR directa de las colonias usando iniciadores diseñados específicamente para la secuencia insertada. Dichas técnicas son bien conocidas y de rutina en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 25 1989 y Ausubel *et al.*, 1995).

Un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención puede usarse en combinación con uno o más microorganismos transformados de conformidad con la presente invención.

30 Por ejemplo, uno o más microorganismos transformados de conformidad con la presente invención capaces de convertir la D-xilosa a D-xilulosa, pueden usarse en combinación con uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste de: un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la L-arabinasa a D-xilulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la L-arabinasa a L-ribulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-lixosa a D-xilulosa; y un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-ribosa a D-ribulosa.

35 En otro ejemplo, uno o más microorganismos transformados de conformidad con la presente invención capaces de convertir la L-arabinasa a D-xilulosa, pueden usarse en combinación con uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste de: un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-xilosa a D-xilulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la L-arabinasa a L-ribulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-lixosa a D-xilulosa; y un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-ribosa a D-ribulosa.

40 En otro ejemplo, uno o más microorganismos transformados de conformidad con la presente invención capaces de convertir la L-arabinasa a L-ribulosa, pueden usarse en combinación con uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste de: un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-xilosa a D-xilulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la L-arabinasa a D-xilulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-lixosa a D-xilulosa; y un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-ribosa a D-ribulosa.

45 En otro ejemplo, uno o más microorganismos transformados de conformidad con la presente invención capaces de convertir la D-lixosa a D-xilulosa, pueden usarse en combinación con uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste de: un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la L-arabinasa a D-xilulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la L-arabinasa a L-ribulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-xilosa a D-xilulosa; y un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-ribosa a D-ribulosa.

50 En otro ejemplo adicional, uno o más microorganismos transformados de conformidad con la presente invención capaces de convertir la D-ribosa a D-ribulosa, pueden usarse en combinación con uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste de: un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la L-arabinasa a D-xilulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-ribosa a D-ribulosa.

invención capaz de convertir la L-arabinasa a L-ribulosa; un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-xilosa a D-xilulosa; y un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención capaz de convertir la D-xilosa a D-xilulosa.

5 Los microorganismos transformados de conformidad con la presente invención pueden usarse en combinación con uno o más de otros microorganismos. Por ejemplo, uno o más microorganismos transformados de conformidad con la presente invención pueden cultivarse en combinación con por lo menos un microorganismo capaz de producir, bajo ciertas condiciones de cultivo, uno o más componentes seleccionados de la lista que consiste de: etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, acetaldehído, ácido itacónico, cresol, ácido 3-hidroxi-*propiónico*, poli-3-hidroxi-*alcanoatos*, ácido protocatecuico, pirocatecol, guayacol, veratrol, vanilina, ácido vanílico, alcohol vanilílico, ácido mucónico, ácido adípico, ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-metoxibenzoico, 4-aminobenzoato, 4-hidroxianilina, 4-metoxianilina, quinol, anisol, fenol, ácido antranílico, 3-hidroxiantranilato, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, 2-aminofenol, 1,4-ciclohexanodiona y aminoácidos aromáticos.

15 En otro aspecto, se provee una combinación de (i) uno o más microorganismos transformados de conformidad con la presente invención, y (ii) por lo menos otro microorganismo capaz de producir, bajo ciertas condiciones de cultivo, uno o más componentes seleccionados de la lista que consiste de: etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, acetaldehído, ácido itacónico, cresol, ácido 3-hidroxi-*propiónico*, poli-3-hidroxi-*alcanoatos*, ácido protocatecuico, pirocatecol, guayacol, veratrol, vanilina, ácido vanílico, alcohol vanilílico, ácido mucónico, ácido adípico, ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-metoxibenzoico, 4-aminobenzoato, 4-hidroxianilina, 4-metoxianilina, quinol, anisol, fenol, ácido antranílico, 3-hidroxiantranilato, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, 2-aminofenol, 1,4-ciclohexanodiona y aminoácidos aromáticos.

Además, la presente invención provee un inóculo que comprende una de las combinaciones mencionadas anteriormente.

Además, se provee un medio de cultivo que comprende una de las combinaciones mencionadas anteriormente.

25 Además, la presente descripción provee un kit que comprende: (i) un inóculo que comprende uno o más microorganismos de conformidad con la presente invención, y (ii) un inóculo que comprende uno o más de otros microorganismos mencionados en la presente.

#### Vector de expresión

El término "vector de expresión" significa una construcción capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

30 En un aspecto, el vector de expresión es incorporado en el genoma de un microorganismo adecuado. El término "incorporado" abarca de preferencia incorporación estable en el genoma.

Las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente pueden estar presentes en un vector en el cual la secuencia de nucleótidos es enlazada operablemente a secuencias reguladoras capaces de proveer la expresión de la secuencia de nucleótidos por un microorganismo hospedero adecuado.

Los vectores son transformados en un microorganismo hospedero adecuado como se describe en la presente.

35 La elección del vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido o vector de fago, dependerá con frecuencia del microorganismo en el cual será introducido.

40 Los vectores para su uso en la presente pueden contener una o más secuencias de nucleótidos de marcadores seleccionables – tal como una secuencia de nucleótidos que confiera resistencia a antibióticos, por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. En forma alternativa, la selección puede lograrse por co-transformación (como se describe en el documento WO91/17243).

Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo, para transfectar, transformar, transducir o infectar un microorganismo hospedero.

45 El vector puede comprender además una secuencia de nucleótidos que permita que el vector se replique en el microorganismo hospedero en cuestión. Ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

En un aspecto preferido, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa.

De preferencia, un vector de expresión como se menciona en la presente, comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa.

50 De preferencia, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende por lo menos un vector de expresión que codifica para xilosa reductasa y/o D-xilulosa reductasa.

En otro aspecto preferido, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende un vector de expresión que codifica para xilosa reductasa y un vector de expresión que codifica para D-xilulosa reductasa.

En otro aspecto, de preferencia, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende por lo menos un vector de expresión que codifica para xilosa isomerasa.

5 En otro aspecto, de preferencia, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende por lo menos un vector de expresión que codifica para arabinosa reductasa y/o L-arabitol 4-deshidrogenasa y/o L-xilulosa reductasa y/o D-xilulosa reductasa.

En otro aspecto preferido, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende un vector de expresión que codifica para arabinosa reductasa, un vector de expresión que codifica para L-arabitol 4-deshidrogenasa, un vector de expresión que codifica para L-xilulosa reductasa y un vector de expresión que codifica para D-xilulosa reductasa.

10 En otro aspecto preferido, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende un vector de expresión que codifica para L-arabinosa isomerasa.

De preferencia, en otro aspecto, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende por lo menos un vector de expresión que codifica para L-arabinosa isomerasa y/o ribulocinasa y/o ribulosa fosfato 4-epimerasa.

15 En otro aspecto preferido, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende un vector de expresión que codifica para L-arabinosa isomerasa, un vector de expresión que codifica para ribulocinasa y un vector de expresión que codifica para ribulosa fosfato 4-epimerasa.

En otro aspecto preferido, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende por lo menos un vector de expresión que codifica para D-lixosa isomerasa.

20 En otro aspecto preferido, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende un vector de expresión que codifica para D-ribosa isomerasa.

De preferencia, en otro aspecto, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, puede comprender además por lo menos un vector de expresión que codifica para una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste de xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa, y cualquier otra enzima de la vía de la pentosa fosfato. De preferencia, dicho microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende además por lo menos un vector de expresión que codifica para xilulocinasa y/o D-ribulocinasa. Más preferiblemente, dicho microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende además por lo menos un vector de expresión que codifica para xilulocinasa. En otra modalidad, de preferencia, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende además por lo menos un vector de expresión que codifica para ribulosa-5-fosfato epimerasa y/o ribosa-5-fosfato isomerasa y/o transaldolasa y/o transcetolasa.

35 En un aspecto, un vector de expresión como se menciona en la presente, puede codificar además para una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste de una aldosa-1-epimerasa, xilosa reductasa, D-xilulosa reductasa, xilosa isomerasa, arabinosa reductasa, L-arabitol 4-deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa, L-arabinosa isomerasa, ribulocinasa, ribulosa fosfato 4-epimerasa, D-lixosa isomerasa, D-ribosa isomerasa, xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, transaldolasa y transcetolasa.

40 En un aspecto, un vector de expresión como se menciona en la presente, puede codificar además para una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste de xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, D-ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa, y cualquier otra enzima de la vía de la pentosa fosfato. En un aspecto preferido, un vector de expresión como se describe en la presente codifica además para xilulocinasa y/o D-ribulocinasa. Más preferiblemente, dicho vector de expresión como se menciona en la presente, codifica además para xilulocinasa. En otra modalidad, de preferencia, el vector de expresión como se menciona en la presente codifica además para ribulosa-5-fosfato epimerasa y/o ribosa-5-fosfato isomerasa y/o transaldolasa y/o transcetolasa. En otra modalidad más preferida, de preferencia el vector de expresión como se menciona en la presente codifica además para ribosa-5-fosfato isomerasa y/o transaldolasa y/o transcetolasa.

En un aspecto preferido, el microorganismo capaz de convertir una aldopentosa a una cetopentosa como se menciona en la presente, comprende además por lo menos un vector de expresión que codifica para una aldosa-1-epimerasa.

50 De preferencia, un vector de expresión como se menciona en la presente comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa.

#### Secuencias reguladoras

55 En algunas aplicaciones, la secuencia o secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente son enlazadas operablemente a una secuencia reguladora que es capaz de proveer la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como por el microorganismo elegido. A manera de ejemplo, la presente descripción abarca el uso de un vector que comprende la secuencia o secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente enlazadas operablemente a dicha secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

El término “enlazadas operablemente”, se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera deseada. Una secuencia reguladora “enlazada operablemente” a una secuencia codificante, es ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias control.

- 5 El término “secuencias reguladoras”, incluye promotores e intensificadores y otras señales de regulación de la expresión.

El término “promotor” se usa en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de unión de la ARN polimerasa.

- 10 La expresión incrementada de la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican para la enzima o enzimas mencionadas en la presente, puede lograrse también por la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo, regiones de promotor, regiones de secuencia guía de secreción y regiones de terminador.

De preferencia, la secuencia o secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente son enlazadas operablemente a por lo menos un promotor.

Otros promotores pueden usarse incluso para dirigir la expresión del polipéptido o polipéptidos mencionados en la presente.

- 15 Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en una célula de bacteria, hongo o levadura, son bien conocidos en la técnica.

El promotor puede incluir adicionalmente características que aseguren o que incrementen la expresión en un hospedero adecuado. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas tales como una caja de Pribnow o una caja de TATA.

#### 20 Construcciones

El término “construcción” – el cual es sinónimo de términos tales como “conjugado”, “cassette” e “híbrido” –, incluye una secuencia de nucleótidos mencionada en la presente unida directamente o indirectamente a un promotor.

- 25 Un ejemplo de una unión indirecta, es la provisión de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia de intrón, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, intermedio entre el promotor y las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente. Lo mismo se aplica para el término “fusionado” con relación a la presente descripción, el cual incluye unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no abarcan la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína asociada ordinariamente con el promotor del gen de tipo silvestre y cuando están en su ambiente natural.

- 30 La construcción puede expresar o contener incluso un marcador, el cual permite la selección de la construcción genética.

Para algunas aplicaciones, de preferencia, la construcción comprende por lo menos la secuencia o secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente, enlazadas operablemente a un promotor.

#### Promotores

- 35 Como se menciona en la presente, en un aspecto, la presente descripción se refiere a un microorganismo que ha sido transformado con una secuencia de nucleótidos, tal como un promotor, que hace que el microorganismo sobreexpresa una aldosa-1-epimerasa.

Por ejemplo, el promotor es insertado en el genoma de un microorganismo que permite que el microorganismo sobreexpresa (por ejemplo, sobrerregule) una secuencia de nucleótidos endógena que codifica para una aldosa-1-epimerasa.

- 40 En otro aspecto, el promotor es enlazado operablemente a una secuencia de nucleótidos en, por ejemplo, un vector de expresión.

En otro aspecto, el promotor no es reprimido por la presencia de glucosa.

- 45 Ejemplos de promotores adecuados que podrían usarse en microorganismos de conformidad con la presente invención, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, incluyen: el promotor del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD); el promotor del gen de alcohol deshidrogenasa (ADH); y el promotor del gen del factor embrionario tirotrófico (TEF). Ejemplos de promotores adecuados que podrían usarse en *Zymomonas mobilis* y en *Zymobacter palmae*, incluyen el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Zymomonas* (Conway *et al.*, 1987) y el promotor de enolasa de *Zymomonas* (Burnett *et al.*, 1992).

- 50 Promotores preferidos que pueden usarse para sobreexpresar una aldosa-1-epimerasa, pueden ser cualquiera de los elementos reguladores que controlan la expresión de las secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas implicadas en la glucólisis y la fermentación de la glucosa. Ejemplos incluyen, pero no están limitados a:

el promotor P-pgi capaz de expresar el gen PGI1, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el marco de lectura abierto YBR197C;

el promotor P-tpi capaz de expresar el gen TPI1, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el marco de lectura abierto YDR051C;

el promotor P-hxk capaz de expresar el gen HXK2, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el gen FZF1;

5 el promotor P-pfk capaz de expresar el gen PFK1, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el gen YAP1802;

el promotor P-eno capaz de expresar el gen ENO2, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el gen SPC97;

10 el promotor P-tdh capaz de expresar el gen TDH3, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el gen PDX1;

el promotor P-fba capaz de expresar el gen FBA1, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el gen MPE1;

el promotor P-gpm capaz de expresar el gen GPM1, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el marco de lectura abierto YKL151C;

15 el promotor P-pdc capaz de expresar el gen PDC1, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el gen STU2; y

el promotor P-pgm capaz de expresar el gen PGM2, y dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos entre este gen y el gen YKU80.

#### Biocombustible

20 Como se usa en la presente, el término “biocombustible” se refiere a un combustible (por ejemplo, un combustible líquido) adecuado para su uso en (por ejemplo) motores de combustión. Dicho biocombustible se deriva de materia biológica que comprende azúcares de pentosa y/o de los cuales pueden derivarse azúcares de pentosa por hidrólisis por medios enzimáticos y/o por tratamiento con ácido. De preferencia, dicho azúcar de pentosa es una aldopentosa.

25 Materias vegetales – incluyendo desechos de plantas que comprenden material lignocelulósico (por ejemplo: paja de cereales, tales como paja de trigo; pulpa de remolacha azucarera; bagazo de caña de azúcar; forraje de sorgo; forraje de soja; forraje de maíz; troceados de madera; y pulpa de papel) y plantas enteras (tales como aquellas que se cultivan para propósitos de energía, por ejemplo, *Panicum virgatum*) –, son fuentes adecuadas de azúcares de pentosa, en particular azúcares de aldopentosa, para la presente invención. Otras fuentes adecuadas de materia vegetal incluyen productos no de desecho (en otras palabras, fuentes de alimento y forraje), tales como extracto de caña de azúcar, extracto de remolacha azucarera, sorgo, soja, almidón de trigo y almidón de maíz.

De preferencia, el biocombustible mencionado en la presente comprende por lo menos un alcohol.

En un aspecto preferido, el alcohol se selecciona del grupo que consiste de metanol, etanol, propanol y butanol. Más preferiblemente, el biocombustible comprende etanol.

35 De preferencia, dicho biocombustible se obtiene (o es obtenible) – en otras palabras, se extrae (o es extraíble) – del medio de cultivo en el cual un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención se ha cultivado bajo condiciones adecuadas. Dicho biocombustible puede obtenerse (o es obtenible) del medio de cultivo usando técnicas que son de rutina en la materia, tales como la remoción del microorganismo por centrifugación, aislamiento del sobrenadante seguido de destilación, y un paso de deshidratación adicional que da 99.5% de etanol puro.

El biocombustible puede comprender uno o más de otros componentes de biocombustible, tales como butanol.

40 Los uno o más componentes de biocombustible adicionales pueden mezclarse con el biocombustible antes y/o después de que el biocombustible se obtiene o se extrae (es obtenible o extraíble) de un cultivo.

45 En forma alternativa o además, uno o más de otros componentes de biocombustible pueden producirse cultivando un microorganismo en un medio de cultivo antes y/o después y/o al mismo tiempo, que un microorganismo transformado de conformidad con la presente invención sea cultivado o haya sido cultivado en un medio de cultivo para producir el biocombustible.

La presente invención provee además un combustible de transportación que comprende un biocombustible producido usando los microorganismos de conformidad con la presente invención.

El etanol usado como un combustible de transportación puede cumplir dos propósitos diferentes:

50 (i) puede actuar como un aditivo oxigenado que eleva el índice de octano y reduce la emisión en gasolina reformulada (RFG) (reemplazo de MTBE o de tetraetil plomo);

(ii) puede actuar como un sustituto parcial o completo de gasolina regular (RG) para reducir la dependencia del suministro de gasolina.

5 El etanol anhidro tiene un índice de octano de 130, y puede añadirse en concentraciones de 5 a 10% (dependiendo de la estación) a la gasolina regular obtenida directamente de las refinerías. Tradicionalmente, se ha usado tetraetil plomo para elevar el índice de octano; sin embargo, debido a problemas de salud, el uso de plomo ha sido prohibido casi mundialmente. La adición de compuestos oxigenados a la gasolina regular disminuye las emisiones de monóxido de carbono, así como otras partículas que contribuyen a la contaminación atmosférica. Se usó inicialmente éter de metil ter-butilo (MTBE) como un aditivo de compuestos oxigenados; sin embargo, la ocurrencia de contaminación por el MTBE en acuíferos de agua para beber, ha impulsado a algunos estados a que prohíban el uso de este compuesto oxigenado. El etanol se usa cada vez más mundialmente como un reemplazo del MTBE como aditivo de compuestos oxigenados para la fabricación de RFG.

10 Aparte de servir como un aditivo de compuestos oxigenados en la producción de gasolina reformulada, puede usarse etanol como un sustituto general de la gasolina regular. Los automóviles pueden usar mezclas E10 (10% de etanol añadido) sin modificación alguna del motor.

Además, se han fabricado vehículos que pueden usar etanol a 100% - en otras palabras, no existe requerimiento alguno de un combustible basado en fósiles.

15 Los microorganismos transformados de conformidad con la presente invención o los microorganismos preparados por un método de conformidad con la presente invención, son capaces de producir un biocombustible a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación. Como se usa aquí, el término "mayor velocidad" se refiere a un microorganismo transformado que es capaz de producir en el medio de cultivo por lo menos 5%, 10%, 20%, 25%, 30% o 35% más biocombustible (tal como bioetanol) por célula, que el porcentaje que produce el  
20 microorganismo equivalente antes de la transformación cuando se cultiva bajo las mismas condiciones de cultivo por un período dado dentro de la fase de crecimiento exponencial.

#### Compuesto derivado de pentosa

25 Como se usa en la presente, el término "compuesto derivado de pentosa" se refiere a cualquier compuesto derivado de un azúcar de pentosa. El compuesto derivado de pentosa puede derivarse de una aldopentosa. El compuesto derivado de pentosa puede derivarse de una cetopentosa.

Ejemplos de compuestos derivados de pentosa incluyen, pero no están limitados a, etanol, aminoácidos aromáticos, cresol, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, acetaldehído, poli-3-hidroxi-alcanoatos y ácido 3-hidroxi-propiónico. La figura 1 muestra otros compuestos derivados de pentosa, tales como cetopentosas derivadas de aldopentosas. Un producto derivado de pentosa puede ser convertido en otro producto. Por ejemplo, la cetopentosa D-xilulosa, derivada de la aldopentosa D-xilosa, puede ser convertida por medio de la vía de la pentosa fosfato en etanol.

30 De preferencia, dicho compuesto derivado de pentosa es etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, acetaldehído, ácido itacónico, cresol, ácido 3-hidroxi-propiónico, poli-3-hidroxi-alcanoatos, ácido protocatecuico, pirocatecol, guayacol, veratrol, vanilina, ácido vanílico, alcohol vanílico, ácido mucónico, ácido adípico, ácido 4-hidroxi-benzoico, 4-hidroxi-benzaldehído, ácido 4-metoxibenzoico, 4-aminobenzoato, 4-hidroxi-anilina, 4-metoxianilina,  
35 quinol, anisol, fenol, ácido antranílico, 3-hidroxi-antranilato, ácido 2,3-dihidroxi-benzoico, 2-aminofenol, 1,4-ciclohexanodiona y aminoácidos aromáticos.

De preferencia, dicho compuesto derivado de pentosa es etanol, cresol, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico y ácido 3-hidroxi-propiónico.

Más preferiblemente, dicho compuesto derivado de pentosa es etanol.

#### 40 Medio de cultivo

El medio de cultivo comprende por lo menos una pentosa. En un aspecto preferido, el medio de cultivo comprende por lo menos una aldopentosa.

45 De preferencia, los microorganismos transformados se cultivan en el medio de cultivo óptimo para dicho microorganismo. Mediante el uso de técnicas de rutina, puede determinarse el medio de cultivo óptimo; además, pueden determinarse las condiciones de crecimiento óptimas.

En un aspecto, dicho medio de cultivo comprende aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 4%, aproximadamente 8%, aproximadamente 15% o aproximadamente 25% de aldopentosa antes de la inoculación con el microorganismo (es decir, en el tiempo cero).

50 De preferencia, dicho medio de cultivo comprende las cantidades óptimas de sales, vitaminas y otros nutrientes necesarios para el microorganismo.

Los microorganismos se cultivan de preferencia a su temperatura de crecimiento óptima. El experto en la técnica habría sido capaz de determinar fácilmente la temperatura óptima a la cual se cultivan los microorganismos mencionados en la presente.

En una modalidad, los microorganismos se cultivan a aproximadamente 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ó 37°C.

55 En una modalidad, los microorganismos se cultivan a aproximadamente entre 35°C y 39°C, de preferencia aproximadamente entre 36°C y 38°C, más preferiblemente a aproximadamente entre 35.5°C y 37.5°C.

De preferencia, los microorganismos se cultivan por aproximadamente 3 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas o aproximadamente 96 horas.

En un aspecto, el microorganismo, en particular el microorganismo transformado, es tolerante a alcoholes y/o tolerante a ácidos.

5 El término “tolerante a alcoholes” con relación a la presente invención, se refiere a microorganismos que son capaces de crecer en un medio de cultivo que comprende por lo menos 2%, 5%, 10% o 15% de alcohol.

Como se menciona en la presente, el término “tolerante a ácidos” se refiere a microorganismos que son capaces de crecer en un medio de cultivo que tiene un pH igual a o menor que 6.5, 6.0, 5.0, 4.0 ó 3.0.

10 En un aspecto preferido, el medio de cultivo es inoculado con por lo menos  $5 \times 10^7$  a  $5 \times 10^{11}$  células por kg de medio de cultivo, de preferencia  $5 \times 10^8$  a  $5 \times 10^{10}$  células por kg de medio de cultivo, de preferencia  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  células por kg de medio de cultivo, y más preferiblemente aproximadamente  $5 \times 10^9$  células por kg de medio de cultivo.

Los términos “inóculo” y “cultivo iniciador”, son intercambiables.

#### Fuentes de azúcares de pentosa

Los azúcares de pentosa (en particular azúcares de aldopentosa) se derivan o son derivables de plantas.

15 Los azúcares de pentosa (en particular azúcares de aldopentosa) pueden derivarse de: materias vegetales usadas típicamente como fuentes de alimento o pienso (tales como: caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo, trigo y maíz – las cuales son materias vegetales ricas en almidón y ricas en azúcar); plantas enteras (tales como aquellas que se cultivan para propósitos de energía, por ejemplo, *Panicum virgatum*); y, en particular, materias (vegetales) agrícolas de desecho (tales como: paja de cereales, por ejemplo, paja de trigo; pulpa de remolacha azucarera; bagazo, por ejemplo, bagazo de caña de azúcar; forrajes, por ejemplo, forrajes de sorgo, soya o maíz; y troceados de madera).

20 Las fuentes de azúcares de pentosa para el medio de cultivo descrito en la presente, incluyen materiales lignocelulósicos normalmente considerados como material de desecho agrícola. Los tallos, pedúnculos y hojas contienen material lignocelulósico. Los bagazos de caña de azúcar, forrajes de maíz y troceados de madera (sólo hemicelulosa), son tres fuentes fácilmente accesibles de material lignocelulósico, ya que éstos se colectan o almacenan fácilmente en grandes cantidades por varias razones.

25 El material lignocelulósico consiste principalmente de largas cadenas de azúcar. En promedio, dos terceras partes de estos azúcares son azúcares de hexosa, los cuales están presentes principalmente en la celulosa, y una tercera parte de los azúcares son azúcares de pentosa presentes principalmente en polímeros de arabinoxilano.

Una cantidad significativa del azúcar de pentosa derivado de hemicelulosa, es xilosa.

30 Los materiales lignocelulósicos pueden ser hidrolizados para liberar los azúcares de hexosa y/o pentosa en los azúcares de cadena larga de la celulosa, hemicelulosa y lignina.

35 La hidrólisis de los materiales lignocelulósicos puede llevarse a cabo por tratamiento ácido a temperatura elevada. Sin embargo, este tratamiento puede generar subproductos derivados de azúcar que son tóxicos para la mayoría de los microorganismos, y previene la conversión de los azúcares en etanol. Dichos subproductos tóxicos (si se generan) pueden ser removidos, pero esto es generalmente no económico.

En forma alternativa, los materiales lignocelulósicos pueden ser hidrolizados usando enzimas que hidrolizan la celulosa y hemicelulosa. En forma ventajosa, este procedimiento evita la generación de productos secundarios tóxicos.

40 En un aspecto preferido, el medio de cultivo comprende material derivado de uno o más materiales lignocelulósicos que han sido tratados (ejemplos de dichas técnicas de tratamiento incluyen: tratamiento con vapor, explosión con vapor, oxidación en húmedo, hidrólisis ácida, oxidación en húmedo alcalina y expansión de fibras con amoníaco) para liberar azúcares de hexosa y/o pentosa. De preferencia, el material lignocelulósico se trata con un procedimiento de hidrólisis enzimática. Dicho material lignocelulósico hidrolizado puede tratarse adicionalmente para extraer los azúcares antes del uso de dicho extracto en un medio de cultivo.

#### Hidrólisis de material lignocelulósico

45 *Tratamiento mecánico inicial:*

El material lignocelulósico es desmenuzado en piezas más pequeñas, como y cuando se considere necesario. Por ejemplo, la paja de trigo es cortada en piezas de aproximadamente 5 cm de longitud.

*Pre-tratamiento hidrotérmico subsiguiente:*

50 El pre-tratamiento hidrotérmico del material lignocelulósico puede llevarse a cabo como un pre-tratamiento con vapor seguido de un paso de lavado, produciendo de esta manera una fracción de fibras y una fracción de líquido. La fracción de fibras contiene más de 90% de la celulosa, la lignina presente originalmente en el material celulósico, y parte de las hemicelulosas. La fracción de líquido contiene azúcares de las hemicelulosas (azúcares C5), más de 90% de cloruros de álcali comprendidos en la biomasa lignocelulósica, y la mayoría de los inhibidores de fermentación que surgen del pre-tratamiento de la materia prima lignocelulósica.

Típicamente, paja de trigo es calentada por vapor a una temperatura entre 180 y 200°C, con un tiempo de residencia de 5 a 15 minutos. La biomasa pre-tratada es descargada del reactor de presión y lavada y prensada. El vapor liberado es colectado y reutilizado para la evaporación de la fracción de líquido hasta melazas de pienso.

Hidrólisis enzimática:

- 5 La hidrólisis subsiguiente de los polímeros de azúcar puede llevarse a cabo por la adición de celulasas y hemicelulasas, ya sea antes de la fermentación o durante la fermentación, o ambas, entre otras cosas, un procedimiento simultáneo de sacarificación y fermentación.

Hexosa

- 10 Los azúcares de hexosa tienen 6 átomos de carbono. Las aldohexosas tienen un aldehído en la posición 1, y las cetohehexosas tienen una cetona en la posición 2. La glucosa es un ejemplo de una aldohexosa. La fructosa es un ejemplo de una cetohehexosa.

Pentosa

- 15 Los azúcares de pentosa tienen 5 átomos de carbono. Las pentosas tienen un grupo funcional aldehído en la posición 1 (aldopentosas), o un grupo funcional cetona en la posición 2 (cetopentosas).

Aldopentosa

De preferencia, dicha aldopentosa se selecciona del grupo que consiste de xilosa, arabinosa, ribosa y lixosa. Más preferiblemente, la aldopentosa es xilosa o arabinosa.

En un aspecto preferido, dicha aldopentosa es xilosa. Más preferiblemente, dicha aldopentosa es D-xilosa.

Cetopentosa

- 20 De preferencia, dicha cetopentosa es xilulosa o ribulosa.

En un aspecto preferido, dicha cetopentosa es xilulosa. Más preferiblemente, dicha cetopentosa es D-xilulosa.

En un aspecto preferido, dicha cetopentosa es ribulosa. Más preferiblemente, dicha ribulosa es D-ribulosa.

Conversión de una aldopentosa a una cetopentosa

- 25 Ejemplos de una aldopentosa que es convertida a una cetopentosa incluyen, pero no están limitados a: la conversión de xilosa a xilulosa; la conversión de arabinosa a xilulosa; la conversión de arabinosa a ribulosa; la conversión de lixosa a xilulosa; la conversión de ribosa a ribulosa; la conversión de D-xilosa a D-xilulosa; la conversión de L-arabinosa a L-xilulosa o D-xilulosa; la conversión de L-arabinosa a L-ribulosa; la conversión de D-lixosa a D-xilulosa; y la conversión de D-ribosa a D-ribulosa.

- 30 Sin que se desee que sea limitado por la teoría, típicamente las enzimas implicadas en la conversión de D-xilosa a D-xilulosa en hongos, son la xilosa reductasa y D-xilulosa reductasa.

En bacterias, sin que se desee que sea limitado por la teoría, la enzima que está implicada típicamente en la conversión de D-xilosa a D-xilulosa, es la xilosa isomerasa.

- 35 Sin que se desee que sea limitado por la teoría, las enzimas que están implicadas generalmente en la conversión de L-arabinosa a L-xilulosa en hongos, son la arabinosa reductasa, L-arabinitol 4-deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa y D-xilulosa reductasa.

En bacterias, sin que se desee que sea limitado por la teoría, típicamente la enzima implicada en la conversión de L-arabinosa a L-ribulosa es la L-arabinosa isomerasa.

Sin que se desee que sea limitado por la teoría, la enzima que puede estar implicada en la conversión de D-lixosa a D-xilulosa en bacterias, es la lixosa isomerasa.

- 40 Sin que se desee que sea limitado por la teoría, la enzima que puede estar implicada en la conversión de D-ribosa a D-ribulosa, es la D-ribosa isomerasa.

Enzimas

- 45 Los números de la nomenclatura para las enzimas (números de EC) mencionados en la presente, se refieren a las recomendaciones del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, sobre la nomenclatura y clasificación de las enzimas, publicada en 1992.

- 50 Las enzimas mencionadas en la presente pueden ser producidas por secuencias de nucleótidos derivadas de una amplia variedad de fuentes. En un aspecto, las secuencias de nucleótidos que codifican para las enzimas mencionadas en la presente, pueden derivarse o pueden ser derivables de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Piromyces sp.*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Pichia stipitis* o *Saccharomyces cerevisiae*.

Aldosa-1-epimerasa (EC 5.1.3.3)

Una aldosa-1-epimerasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la aldopentosa.

La aldosa-1-epimerasa tiene el número de nomenclatura de EC 5.1.3.3. La aldosa-1-epimerasa puede ser referida como una mutarrotasa o una aldosa mutarrotasa.

5 El término aldosa-1-epimerasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir una  $\alpha$ -aldopentosa a una  $\beta$ -aldopentosa, y viceversa.

En una modalidad preferida, la aldosa-1-epimerasa es codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de: AAD20257 versión 1, ABX75760 versión 1, AAK05605 versión 1, AAD20245 versión 1, AAD20251 versión 1, ABJ73095 versión 1, ABI49935 versión 1 y AAO80762 versión 1 (números de acceso del NCBI).

10 Más preferiblemente, la aldosa-1-epimerasa se selecciona del grupo que consiste de: AAD20257, ABX75760, AAK05605, AAD20245 y AAD20251.

15 Ejemplos de aldosa-1-epimerasas adecuadas para su uso como se describe en la presente, incluyen la aldosa-1-epimerasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen de aldosa-1-epimerasa de *Lactococcus lactis* (número de acceso del NCBI AAD20245 versión 1); la secuencia de nucleótidos del gen GAL10 de *Saccharomyces cerevisiae* (en particular, la parte que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene actividad de mutarrotasa); y la secuencia de nucleótidos del gen GAL10 de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae* (en particular, la parte que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene actividad de mutarrotasa).

Aldosa reductasa (EC 1.1.1.21)

20 La aldosa reductasa tiene el número de nomenclatura de EC 1.1.1.21. La aldosa reductasa puede ser referida como: poliol deshidrogenasa, aldehído reductasa, ALR2, NADPH-aldopentosa reductasa, NADPH-aldosa reductasa, alditol:NADP oxidorreductasa, o alditol:NADP<sup>+</sup> 1-oxidorreductasa.

El término aldosa reductasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir un alditol a una aldosa, y viceversa.

25 Una aldosa reductasa puede reducir más de un tipo de aldosa. Por ejemplo, la misma enzima puede ser capaz de reducir D-xilosa y L-arabinosa, y dicha enzima puede denominarse de esta manera como aldosa reductasa, o puede denominarse más específicamente después de uno de los sustratos, por ejemplo, xilosa reductasa.

Xilosa reductasa (EC 1.1.1.21)

En una modalidad, la aldosa reductasa es una xilosa reductasa. La xilosa reductasa tiene el número de nomenclatura de EC 1.1.1.21.

El término xilosa reductasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la D-xilosa a xilitol, y viceversa.

30 Una xilosa reductasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la D-xilosa.

35 Ejemplos de xilosa reductasas adecuadas para su uso como se describe en la presente, incluyen la xilosa reductasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen de xilosa reductasa de *Pichia stipitis* (PsXR); la secuencia de nucleótidos del gen de xilosa reductasa de la cepa DSM3651 de *Pichia stipitis* (PsXR) - número de acceso del NCBI X59465 versión 1; la secuencia de nucleótidos de *Candida tenuis* (dicha secuencia de nucleótidos que codifica para xilosa reductasa, puede obtenerse como es descrito por Kavanagh *et al.*, 2003); y la secuencia de nucleótidos de *Neurospora crassa* (dicha secuencia de nucleótidos que codifica para xilosa reductasa, puede obtenerse como es descrito por Woodyer *et al.*, 2005).

Arabinosa reductasa (EC 1.1.1.21)

40 En otra modalidad, la aldosa reductasa es una arabinosa reductasa. La arabinosa reductasa tiene el número de nomenclatura de EC 1.1.1.21.

El término arabinosa reductasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la L-arabinosa a L-arabitol, y viceversa.

Una arabinosa reductasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la L-arabinosa.

45 Las D-xilosa reductasas conocidas comúnmente en la técnica, pueden actuar también sobre la L-arabinosa como un sustrato con actividad similar. Por lo tanto, el término L-arabinosa reductasa puede referirse también a enzimas que se clasifican como D-xilosa reductasas, y las xilosa reductasas mencionadas en la presente como adecuadas para introducir el metabolismo de la xilosa, son asimismo adecuadas para su uso para introducir el metabolismo de la arabinosa a un microorganismo.

50 En otra modalidad adicional, la aldosa reductasa puede ser capaz de convertir la L-lixosa a L-arabitol, y viceversa. En otra modalidad, la aldosa reductasa puede ser capaz de convertir la D-lixosa a D-arabitol, y viceversa.

En otra modalidad, la aldosa reductasa puede ser capaz de convertir la ribosa a ribitol (en particular la D-ribosa a D-ribitol), y viceversa.

Xilulosa reductasa (EC 1.1.1.9 y EC 1.1.1.10)

El término xilulosa reductasa abarca la D-xilulosa reductasa y L-xilulosa reductasa.

*D-xilulosa reductasa (EC 1.1.1.9)*

5 La D-xilulosa reductasa tiene el número de nomenclatura de EC 1.1.1.9. La D-xilulosa reductasa puede ser referida como xilitol deshidrogenasa, xilitol-2-deshidrogenasa, 2,3-cis-poliol(DPN)deshidrogenasa (C3-5), xilitol deshidrogenasa dependiente de NAD, eritritol deshidrogenasa o pentitol-DPN deshidrogenasa.

El término D-xilulosa reductasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir el xilitol a D-xilulosa, y viceversa.

Una D-xilulosa reductasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre el xilitol.

10 Ejemplos de D-xilulosa reductasas adecuadas para su uso como se describe en la presente, incluyen la D-xilulosa reductasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen de D-xilulosa de *Pichia stipitis* (PsXDH); y la secuencia de nucleótidos del gen de D-xilulosa reductasa de la cepa DSM3651 de *Pichia stipitis* (PsXDH) - número de acceso del NCBI X55392 versión 1.

*L-xilulosa reductasa (EC 1.1.1.10)*

15 La L-xilulosa reductasa tiene el número de nomenclatura de EC 1.1.1.10. La L-xilulosa reductasa puede ser referida como L xilitol deshidrogenasa.

El término L-xilulosa reductasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la L-xilulosa a xilitol, y viceversa.

Una L-xilulosa reductasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la L-xilulosa.

Una secuencia de nucleótidos que codifica para L-xilulosa reductasa puede obtenerse de *Aspergillus niger* como es descrito por Witteveen *et al.* (1994), o de la levadura *Ambrosiozyma monospora* (Verho *et al.*, 2004).

20 Xilulocinasa (EC 2.7.1.17)

La xilulocinasa tiene el número de nomenclatura de EC 2.7.1.17. La xilulocinasa puede ser referida como D-xilulocinasa.

El término xilulocinasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la D-xilulosa a D-xilulosa 5-fosfato, y viceversa.

Una xilulocinasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la D-xilulosa.

25 Ejemplos de xilulocinasas adecuadas para su uso como se describe en la presente, incluyen la xilulocinasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen de xilulocinasa de *Pichia stipitis* (PsXKS); la secuencia de nucleótidos del gen de xilulocinasa de la cepa DSM3651 de *Pichia stipitis* (PsXKS) - número de acceso del NCBI AF 127802 versión 1; la secuencia de nucleótidos del gen de xilulocinasa de *S. cerevisiae* (ScXKS); y la secuencia de nucleótidos del gen de xilulocinasa de la cepa D0002 de *S. cerevisiae* (ScXKS) - número de acceso del NCBI X61377 versión 1.

30 Xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5)

La xilosa isomerasa tiene el número de nomenclatura de EC, EC 5.3.1.5. La xilosa isomerasa puede ser referida como D-xilosa isomerasa, D-xilosa cetoisomerasa o D-xilosa cetol-isomerasa.

El término xilosa isomerasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la D-xilosa a D-xilulosa, y viceversa.

Una xilosa isomerasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la D-xilosa.

35 Ejemplos de xilosa isomerasas adecuadas para su uso como se describe en la presente, incluyen la xilosa isomerasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen de isomerasa de *Piromyces xylosa* (PmXI); la secuencia de nucleótidos del gen de xilosa isomerasa de la cepa E2 de *Piromyces* sp. (PmXI) - número de acceso del NCBI AJ249909 versión 1; y la secuencia de nucleótidos del gen de xilosa isomerasa de *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (ThXI) - número de acceso del NCBI D00756 versión 1; SEQ ID No 2 y SEQ ID No 3.

40 D-arabinitol 4-deshidrogenasa (EC 1.1.1.11)

La D-arabinitol 4-deshidrogenasa tiene el número de nomenclatura de EC 1.1.1.11. La D-arabinitol 4-deshidrogenasa puede ser referida como D-arabitol deshidrogenasa o arabitol deshidrogenasa.

El término D-arabinitol 4-deshidrogenasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir el D-arabinitol a D-xilulosa, y viceversa.

45 Una D-arabinitol 4-deshidrogenasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre el D-arabinitol.

Una D-arabinitol 4-deshidrogenasa adecuada y el gen correspondiente, son descritos por Cheng *et al.*, 2005.

L-arabinitol 4-deshidrogenasa (EC 1.1.1.12)

La L-arabinitol 4-deshidrogenasa tiene el número de nomenclatura de EC 1.1.1.12. La L-arabinitol 4-deshidrogenasa puede ser referida como L-arabitol 4-deshidrogenasa o pentitol-DPN deshidrogenasa.

El término L-arabinitol 4-deshidrogenasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir el L-arabinitol a L-xilulosa, y viceversa.

Una L-arabinitol 4-deshidrogenasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre el L-arabinitol.

Una L-arabinitol 4-deshidrogenasa adecuada y el gen correspondiente, se describen en Richard *et al.* (2001).

5 L-arabinosa isomerasa (EC 5.3.1.4)

La L-arabinosa isomerasa tiene el número de nomenclatura de EC 5.3.1.4. La L-arabinosa isomerasa puede ser referida como L-arabinosa cetol-isomerasa.

El término L-arabinosa isomerasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la L-arabinosa a L-ribulosa, y viceversa.

10 Una L-arabinosa isomerasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la L-arabinosa.

Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica para L-arabinosa isomerasa, es la secuencia de nucleótidos que puede obtenerse de la cepa NCIMB8826 de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917) (gen descrito en el código de acceso del NCBI NC\_004567 versión 1).

Ribulocinasa (EC 2.7.1.16)

15 La ribulocinasa tiene el número de nomenclatura de EC 2.7.1.16. La ribulocinasa puede ser referida como L-ribulocinasa.

El término ribulocinasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir, (i) la L-ribulosa a L-ribulosa 5-fosfato, y viceversa; y/o (ii) la D-ribulosa a D-ribulosa 5-fosfato, y viceversa.

Una ribulocinasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la L-ribulosa y/o D-ribulosa.

20 Una secuencia de nucleótidos adecuada que codifica para ribulocinasa puede obtenerse de la cepa NCIMB8826 de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917) (gen descrito en el código de acceso del NCBI NC\_004567 versión 1).

L-ribulosa fosfato 4-epimerasa (EC 5.1.3.4)

25 La L-ribulosa fosfato 4-epimerasa tiene el número de nomenclatura de EC 5.1.3.4. La L-ribulosa fosfato 4-epimerasa puede ser referida como ribulosa fosfato 4-epimerasa, fosforribulosa isomerasa, L-ribulosa 5-fosfato 4-epimerasa, AraD o L-Ru5P.

El término L-ribulosa fosfato 4-epimerasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la L-ribulosa 5-fosfato a D-xilulosa 5-fosfato, y viceversa.

Una L-ribulosa fosfato 4-epimerasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la L-ribulosa 5-fosfato.

30 Una secuencia de nucleótidos adecuada que codifica para L-ribulosa fosfato 4-epimerasa, puede obtenerse de la cepa NCIMB8826 de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917) (gen descrito en el código de acceso del NCBI NC\_004567 versión 1).

D-ribitol 4-deshidrogenasa

La D-ribitol 4-deshidrogenasa tiene el número de nomenclatura de EC 1.1.1.56. Esta enzima puede ser referida también como ribitol 2-deshidrogenasa, adonitol deshidrogenasa o ribitol deshidrogenasa.

35 El término D-ribitol 4-deshidrogenasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir el ribitol a D-ribulosa, y viceversa.

Una D-ribitol 4-deshidrogenasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre el D-ribitol.

Una D-ribitol 4-deshidrogenasa adecuada y el gen correspondiente, son descritos por Dothie *et al.*, 1985.

D-lixosa isomerasa (EC 5.3.1.15)

40 La D-lixosa isomerasa tiene el número de nomenclatura de EC 5.3.1.15. Esta enzima puede ser referida también como D-lixosa cetol-isomerasa.

El término D-lixosa isomerasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la D-lixosa a D-xilulosa, y viceversa.

Una D-lixosa isomerasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la D-lixosa.

45 Una secuencia de nucleótidos que codifica para una D-lixosa/L-ribosa isomerasa, puede ser clonada de la cepa DL-28 del organismo *Acinetobacter* sp. (Shimonishi e Izumori, 1996) o de *Aerobacter aerogenes* (Anderson y Allison, 1965).

Ribosa isomerasa (EC 5.3.1.20)

La ribosa isomerasa tiene el número de nomenclatura de EC 5.3.1.20. Esta enzima puede ser referida también como D-ribosa isomerasa o D-ribosa cetol-isomerasa.

El término ribosa isomerasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la D-ribosa a D-ribulosa, y viceversa.

Una ribosa isomerasa mencionada en la presente, es capaz de actuar sobre la D-ribosa.

La D-ribosa isomerasa se ha encontrado en el organismo *Mycobacterium smegmatis* (Izumori *et al.*, 1975), de donde puede ser clonada.

#### 5 Ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa (EC 5.1.3.1)

La ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa tiene el número de nomenclatura de EC 5.1.3.1. Esta enzima puede ser referida también como: pentosa-5-fosfato 3-epimerasa, fosfocetopentosa 3-epimerasa, fosfocetopentosa epimerasa, fosforribulosa epimerasa, ribulosa-fosfato 3-epimerasa; D-ribulosa 5-fosfato epimerasa; D-ribulosa fosfato-3-epimerasa; D-ribulosa-5-P 3-epimerasa; D-xilulosa-5-fosfato 3-epimerasa; eritrosa-4-fosfato isomerasa; ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa; y xilulosa fosfato 3-epimerasa.

El término ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la D-ribulosa 5-fosfato a D-xilulosa 5-fosfato, y viceversa.

Ejemplos de ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa adecuados para su uso como se describe en la presente, incluyen la ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen *RPE1* de *S. cerevisiae*; la secuencia de nucleótidos del gen *RPE1* de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*; la secuencia de nucleótidos del código de acceso del NCBI NP\_012414 versión 1; y la ribulosa-5-fosfato isomerasa de *P. stipitis* que puede encontrarse en el número de acceso del NCBI NP\_012414 versión 1.

#### 15 Ribosa-5-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.6)

La ribosa-5-fosfato isomerasa tiene el número de nomenclatura de EC 5.3.1.6. Esta enzima puede ser referida también como fosfopentoisomerasa, fosfopentosa isomerasa, fosfopentosa isomerasa, fosforribosa isomerasa, ribosa 5-fosfato epimerasa, ribosa fosfato isomerasa, 5-fosforribosa isomerasa o D-ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa.

El término ribosa-5-fosfato isomerasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la D-ribosa 5-fosfato a D-ribulosa 5-fosfato, y viceversa.

Ejemplos de ribosa-5-fosfato isomerasa adecuados para su uso como se describe en la presente, incluyen la ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen *RK11* de *S. cerevisiae*; la secuencia de nucleótidos del gen *RK11* de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*; la secuencia de nucleótidos del código de acceso del NCBI X94335 versión 1; la secuencia de nucleótidos del código de acceso del NCBI NP\_014738 versión 1, y la ribosa-5-fosfato isomerasa de *P. stipitis* que puede encontrarse en el acceso NC\_009043 versión 1.

#### 25 Transcetolasa (EC 2.2.1.1)

La transcetolasa tiene el número de nomenclatura de EC 2.2.1.1. Esta enzima puede ser referida también como glicolaldehidotransferasa.

El término transcetolasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la sedoheptulosa 7-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato a D-ribosa 5-fosfato + D-xilulosa 5-fosfato, y viceversa.

Ejemplos de transcetolasas adecuadas para su uso como se describe en la presente, incluyen la transcetolasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen *TKL1* de *Saccharomyces cerevisiae*; la secuencia de nucleótidos del gen *TKL1* de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae*; la secuencia de nucleótidos del código de acceso del NCBI X73224 versión 1; la secuencia de nucleótidos del código de acceso del NCBI NP\_015399 versión 1, y la transcetolasa de *P. stipitis* que puede encontrarse en el acceso CP000496 versión 1.

#### 35 Transaldolasa (EC 2.2.1.2)

La transaldolasa tiene el número de nomenclatura de EC 2.2.1.2. Esta enzima puede ser referida también como dihidroxiacetona transferasa, dihidroxiacetona sintasa, formaldehído transcetolasa o glicerona transferasa.

El término transaldolasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir la sedoheptulosa 7-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato a D-eritrosa 4-fosfato + D-fructosa 6-fosfato, y viceversa.

Ejemplos de transaldolasas adecuadas para su uso como se describe en la presente, incluyen la transaldolasa codificada por: la secuencia de nucleótidos del gen *TAL1* de *Saccharomyces cerevisiae*; la secuencia de nucleótidos del gen *TAL1* de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae*; la secuencia de nucleótidos del código de acceso del NCBI X15953 versión 1; la secuencia de nucleótidos del código de acceso del NCBI NP\_013458 versión 1, y la transaldolasa de *P. stipitis* que puede encontrarse en el acceso CP000502 versión 1.

#### 40 Prueba de la aldopentosa

La cantidad de una aldopentosa en una solución (tal como un medio de cultivo) puede determinarse colorimétricamente por el método de floriglucinol, como es descrito por Ebert *et al.* (A Simplified, Colorimetric Micromethod for Xylose in Serum or Urine, with Phloroglucinol, 1979, *Clin. Chem.* 25, no. 8, pp. 1440-1443).

El reactivo al color consiste de 0.5 g de floriglucinol (1,3,5 trihidroxibenceno), 100 ml de ácido acético glacial y 10 ml de HCl concentrado. 50 µl de la muestra se añaden a 950 µl del reactivo al color. La mezcla se calienta a 100°C por 4

minutos, y la absorbancia de la mezcla se lee a 554 nm. La cantidad de una aldopentosa en la muestra se determina de acuerdo con una curva estándar obtenida con la misma aldopentosa como estándar. Este método puede usarse para determinar la cantidad de xilosa, arabinosa, lixosa y ribosa en un medio de cultivo.

#### Prueba de interconversión

5 La capacidad de los microorganismos para catalizar la conversión entre  $\alpha$ -aldopentosa y  $\beta$ -aldopentosa, puede ponerse a prueba por varios métodos. Por ejemplo, la interconversión entre el anómero alfa y el anómero beta de las aldolasas puede ir seguida de RMN, por ejemplo, como es explicado por Ryu *et al.* (2004), o por una prueba acoplada, en donde se sigue la actividad de una enzima específica de uno de los anómeros, como es descrito por Brahma y Bhattacharyya (2004).

#### 10 Prueba de la cetopentosa

La cantidad de una cetopentosa en una solución (tal como un medio de cultivo) puede determinarse colorimétricamente por el método de cisteína-carbazol, como es descrito por Zacharias Dische y Ellen Borenfreund (1951; J. Biol. Chem. 192 (2): 583).

#### Prueba de etanol

15 La cantidad del biocombustible como etanol en una solución (tal como un medio de cultivo) puede determinarse por el uso de una prueba de etanol disponible comercialmente, el kit de K-ETOH, fabricado y vendido por Megazyme International, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Irlanda; o puede determinarse, por ejemplo, por el uso de cromatografía de gases.

#### Vía de la pentosa fosfato

20 Las cetopentosas son convertidas en etanol por la vía de la pentosa fosfato. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 4.

Ejemplos de enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato, incluyen: transcetolasa, transaldolasa, ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa y ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa.

25 En una modalidad, el microorganismo de conformidad con la presente invención ha sido transformado también para expresar o sobreexpresar una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato.

30 En una modalidad, el microorganismo de conformidad con la presente invención ha sido transformado también con una o más secuencias de nucleótidos que hacen que el microorganismo sobreexpresa una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato. Por ejemplo, un promotor es insertado en el genoma de un microorganismo, lo cual permite que el microorganismo sobreexpresa una secuencia de nucleótidos endógena que codifica para una enzima implicada en la vía de la pentosa fosfato.

En otra modalidad, el microorganismo ha sido transformado con una o más secuencias de nucleótidos que codifican para una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato. Por ejemplo, el microorganismo es transformado con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato.

35 De preferencia, el vector de expresión mencionado en la presente comprende uno o más promotores capaces de sobreexpresar una o más secuencias de nucleótidos que codifican para una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato. Ejemplos de dichos promotores incluyen el promotor de GPD, el promotor de TEF y el promotor de ADP. Promotores preferidos que pueden usarse para sobreexpresar una o más secuencias de nucleótidos que codifican para una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato, pueden ser cualquiera de los elementos reguladores que controlan la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas implicadas en la glucólisis y la fermentación de la glucosa.

40 Como se usa en la presente, el término "sobreexpresa" en la frase "una o más secuencias de nucleótidos que hacen que el microorganismo sobreexpresa una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato", y "uno o más promotores capaces de sobreexpresar una o más secuencias de nucleótidos que codifican para una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato", se refiere a un incremento en la expresión de cero a un nivel de expresión, o que va de un menor nivel de expresión a un mayor nivel de expresión (por ejemplo, sobrerregulación) cuando el microorganismo transformado se compara con el microorganismo equivalente antes de la transformación. Los microorganismos que sobreexpresan una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato tienen una capacidad incrementada para catalizar la conversión de una cetopentosa (tal como xilulosa 5-fosfato) a un biocombustible (tal como etanol).

45 De preferencia, dicho microorganismo transformado que sobreexpresa una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato, es capaz de catalizar la conversión de una cetopentosa (tal como xilulosa 5-fosfato) a un biocombustible (tal como etanol) por una velocidad que es por lo menos 10%, 15%, 20% ó 25% mayor que en un microorganismo no transformado.

55 Ejemplos de microorganismos que sobreexpresan una o más enzimas implicadas en la vía de la pentosa fosfato, incluyen: (i) microorganismos transformados con uno o más vectores de expresión que codifican para una o más de

transcetolasa, transaldolasa, ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa y ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; y (ii) microorganismos transformados que sobrerregulan la expresión de una o más secuencias de nucleótidos endógenas que codifican para una o más de transcetolasa, transaldolasa, ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa y ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa (antes de la transformación, dicho microorganismo era capaz de expresar una o más de estas enzimas para una serie dada de condiciones de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial, pero después de la transformación, dicho microorganismo es capaz de expresar una o más de estas enzimas a un mayor nivel, en las mismas condiciones de cultivo, durante la fase de crecimiento exponencial).

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de ejemplos, los cuales tienen el propósito de ayudar al experto en la técnica a llevar a cabo la invención.

## 10 **EJEMPLOS**

### Técnicas generales de metodología de ADN recombinante

La presente invención usa, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, las cuales están dentro de las capacidades del experto en la técnica. Dichas técnicas se explican en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel, F. M. *et al.*, 1995; Roe *et al.*, 1996; Gait, 1984; y Lilley y Dahlberg, 1992.

La presente invención usa, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, las cuales están dentro de las capacidades del experto en la técnica. Dichas técnicas se explican en la literatura. Véase, por ejemplo, J. B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

### EJEMPLO 1A - Construcción de un gen de mutarrotasa sintético (aldosa-1-epimerasa) de *Lactococcus lactis* basada en el código de acceso del NCBI AAD20245 versión 1

El gen de aldosa-1-epimerasa de *L. lactis* (LIMR) entero fue sintetizado y ensamblado por Geneart AG (Regensburg, Alemania). El uso de codones en la secuencia fue optimizado con base en la tabla de uso de codones de levadura de la base de datos del uso de codones de Kazusa (Nakamura *et al.*, 2000). Flanqueando el marco de lectura abierto, un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, se incluyeron en la construcción sintética. La integridad del gen sintético de LIMR se determinó secuenciando ambas cadenas. La secuencia de nucleótidos de LIMR, incluyendo los sitios de restricción de flanqueo, se identifica como SEQ.ID.NO. 1 (es decir, AAD20245), y la secuencia de aminoácidos codificada por esta secuencia de nucleótidos se identifica como SEQ ID No 47. El plásmido hospedero fue nombrado como 0717050pGA14.

### EJEMPLO 1B - Construcción de un gen de xilosa isomerasa sintético de E2 de *Piromyces* basada en el código de acceso del NCBI AJ249909 versión 1

El gen de xilosa isomerasa de *Piromyces* (PmXI) entero fue sintetizado y ensamblado por Geneart AG (Regensburg, Alemania). El uso de codones en la secuencia fue optimizado con base en la tabla de uso de codones de levadura de la base de datos del uso de codones de Kazusa (Nakamura *et al.*, 2000). Flanqueando el marco de lectura abierto, un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, se incluyeron en la construcción sintética. La integridad del gen sintético de PmXI se determinó secuenciando ambas cadenas. La secuencia de nucleótidos de PmXI, incluyendo los sitios de restricción de flanqueo, se identifica como SEQ.ID.NO. 2, y la secuencia de aminoácidos codificada por esta secuencia de nucleótidos se identifica como SEQ ID No 48. El plásmido hospedero fue nombrado como 0717049pGA15.

### EJEMPLO 1C - Construcción del gen de xilosa isomerasa sintético (XylA) de *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* basada en el código de acceso del NCBI D00756 versión 1

El gen de xilosa isomerasa de *T. thermohydrosulfuricus* (ThXI) entero fue sintetizado y ensamblado por Geneart AG (Regensburg, Alemania). El uso de codones en la secuencia fue optimizado con base en la tabla de uso de codones de levadura de la base de datos del uso de codones de Kazusa (Nakamura *et al.*, 2000). Flanqueando el marco de lectura abierto, un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, se incluyeron en la construcción sintética. La integridad del gen sintético de ThXI se determinó secuenciando ambas cadenas. La secuencia de nucleótidos de ThXI, incluyendo los sitios de restricción de flanqueo, se identifica como SEQ.ID.NO. 3, y la secuencia de aminoácidos codificada por esta secuencia de nucleótidos se identifica como SEQ ID No 49. El plásmido hospedero fue nombrado como 0717046pGA14.

### EJEMPLO 2A - Clonación por TOPO del gen de D-xilulocinasa de la cepa DSM3651 de *Pichia stipitis* basada en el código de acceso del NCBI AF127802 versión 1

Se amplificó por PCR el gen de D-xilulocinasa de *P. stipitis* (PsXKS) entero a partir de ADN obtenido de la cepa DSM3651, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 4 y SEQ.ID.NO. 5. Se introdujo un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen PsXKS. Como molde, se usó ADN de la cepa de *P. stipitis* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C y 150 segundos a

72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aisló un fragmento de 1891 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como pCR-Blunt 2 P.stip XKS.

EJEMPLO 2B - Clonación por TOPO del gen de D-xilosa reductasa de la cepa DSM3651 de *Pichia stipitis* basada en el código de acceso del NCBI X59465 versión 1

Se amplificó por PCR el gen de xilosa reductasa de *P. stipitis* (PsXR) entero a partir de ADN obtenido de la cepa DSM3651, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 6 y SEQ.ID.NO. 7. Se introdujo un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen PsXR. Como molde, se usó ADN de la cepa de *P. stipitis* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C y 150 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aisló un fragmento de 976 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como pCR-Blunt 2 P.stip XR.

EJEMPLO 2C - Clonación por TOPO del gen de xilitol deshidrogenasa (D-xilulosa reductasa) de la cepa DSM3651 de *Pichia stipitis* basada en el código de acceso del NCBI X55392 versión 1

Se amplificó por PCR el gen de xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis* (PsXDH) entero a partir de ADN obtenido de la cepa DSM3651, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 8 y SEQ.ID.NO. 9. Se introdujo un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen PsXDH. Como molde, se usó ADN de la cepa de *P. stipitis* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C y 150 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aisló un fragmento de 1108 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como pCR-Blunt 2 P.stip XDH.

EJEMPLO 2D - Clonación por TOPO del gen de L-arabinosa isomerasa (EC 5.3.1.4) de la cepa NCIMB8826 de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917) basada en el código de acceso del NCBI NC\_004567 versión 1

Se amplifica por PCR el gen de L-arabinosa isomerasa de *L. plantarum* (LpAraA) entero a partir de ADN obtenido de la cepa ATCC14917, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 10 y SEQ.ID.NO. 11. Se introduce un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen LpAraA. Como molde, se usa ADN de la cepa de *L. plantarum* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se lleva a cabo PCR a 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separa electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aísla un fragmento de 1444 pb. El fragmento de ADN es clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 2E - Clonación por TOPO del gen de L-ribulocinasa (EC 2.7.1.16) de la cepa NCIMB8826 de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917) basada en el código de acceso del NCBI NC\_004567 versión 1

Se amplifica por PCR el gen de L-ribulocinasa de *L. plantarum* (LpAraB) entero a partir de ADN obtenido de la cepa ATCC14917, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 12 y SEQ.ID.NO. 13. Se introduce un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen LpAraB. Como molde, se usa ADN de la cepa de *L. plantarum* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se lleva a cabo PCR a 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separa electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aísla un fragmento de 1618 pb. El fragmento de ADN es clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 2F - Clonación por TOPO del gen de L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa (EC 5.1.3.4) de la cepa NCIMB8826 de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917) basada en el código de acceso del NCBI NC\_004567 versión 1

Se amplifica por PCR el gen de L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa de *L. plantarum* (LpAraD) entero a partir de ADN obtenido de la cepa ATCC14917, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 14 y SEQ.ID.NO. 15. Se introduce un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen LpAraD. Como molde, se usa ADN de la cepa de *L. plantarum* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se lleva a cabo PCR a 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30

segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separa electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aísla un fragmento de 745 pb. El fragmento de ADN es clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 2G - Clonación por TOPO del gen GAL10 de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae* basada en el código del número de acceso del NCBI Z35888 versión 1

Se amplificó por PCR el gen GAL10 de *S. cerevisiae* (ScGAL10) entero a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 16 y SEQ.ID.NO. 17. Se introdujo un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen ScGAL10. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR por 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 120 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 2116 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como ScGAL10-a23a.

EJEMPLO 2H - Clonación por TOPO de un gen GAL10 truncado [nucleótidos 1084-2100] de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae* basada en el código de acceso del NCBI Z35888 versión 1

Se amplificó por PCR el gen GAL10 truncado N-terminal de *S. cerevisiae* (ScGAL10Δ) a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 18 y SEQ.ID.NO. 17. Se introdujo un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen ScGAL10Δ. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR por 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 120 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 1036 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como ScGALΔ-a24a.

EJEMPLO 3A - Construcción del plásmido PmXI-8a que contiene al gen de xilosa isomerasa de *Piromyces* (PmXI) bajo el control del promotor de GPD y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

El vector promiscuo de alto número de copias P426-GPD de *E. coli/S. cerevisiae* (Mumberg *et al.*, 1995) fue digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de xilosa isomerasa de *Piromyces* fue liberado del vector 0717049pGA15 (descrito en el ejemplo 1b) por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P426-GPD y el fragmento de ADN que codifica para el PmXI se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aislaron. Los dos fragmentos de ADN fueron ligados juntos, resultando en el plásmido nombrado como PmXI-8a.

EJEMPLO 3B - Construcción del plásmido ThXI-5a que contiene al gen de xilosa isomerasa de *T. thermohydrosulfuricus* (ThXI) bajo el control del promotor de GPD y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

El vector promiscuo de alto número de copias P426-GPD de *E. coli/S. cerevisiae* (Mumberg *et al.*, 1995) fue digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de xilosa isomerasa de *T. thermohydrosulfuricus* fue liberado del vector 0717046pGA14 (descrito en el ejemplo 1c) por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P426-GPD y el fragmento de ADN que codifica para el ThXI se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aislaron. Los dos fragmentos de ADN fueron ligados juntos, resultando en el plásmido nombrado como ThXI-5a.

EJEMPLO 3C - Construcción del plásmido PsXKS-14a que contiene al gen de D-xilulocinasa de *P. stipitis* (PsXKS) bajo el control del promotor de GPD y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

El vector promiscuo de alto número de copias P425-GPD de *E. coli/S. cerevisiae* (Mumberg *et al.*, 1995) fue digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de xilulosa cinasa de *P. stipitis* fue liberado del vector pCR-Blunt 2 P.stip XKS (descrito en el ejemplo 2a) por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P425-GPD y el fragmento de ADN que codifica para el PsXKS se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aislaron. Los dos fragmentos de ADN fueron ligados juntos, resultando en el plásmido nombrado como PsXKS-14a.

EJEMPLO 3D - Construcción de los plásmidos PsXR-24a y PsXR-25 que contienen al gen de xilosa reductasa de *P. stipitis* (PsXR) bajo el control del promotor de GPD y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

El vector promiscuo de alto número de copias P424-GPD de *E. coli/S. cerevisiae* y el vector promiscuo de bajo número de copias similar P414-GPD (Mumberg *et al.*, 1995) fue digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de xilosa reductasa de *P. stipitis* fue liberado del vector pCR-Blunt 2 P.stip XR (descrito en el ejemplo 2b) por digestión con NheI y XhoI. Los plásmidos linealizados resultantes P424-GPD y P414-GPD y el fragmento de ADN que codifica para el PsXR se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aislaron. El plásmido linealizado P424-GPD fue ligado junto con el fragmento PsXR, resultando en el plásmido nombrado como PsXR-24a. Asimismo, el plásmido linealizado P414-GPD fue ligado junto con el fragmento PsXR, resultando en el plásmido nombrado como PsXR-25a.

EJEMPLO 3E - Construcción del plásmido PsXDH-11a que contiene al gen de xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis* (PsXDH) (xilulosa reductasa) bajo el control del promotor de GPD y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

El vector promiscuo de alto número de copias P426-GPD de *E. coli/S. cerevisiae* (Mumberg *et al.*, 1995) fue digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de xilulosa deshidrogenasa de *P. stipitis* fue liberado del vector pCR-Blunt 2 P.stip XDH (descrito en el ejemplo 2c) por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P426-GPD y el fragmento de ADN que codifica para el PsXDH se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aislaron. Los dos fragmentos de ADN fueron ligados juntos, resultando en el plásmido nombrado como PsXDH-11a.

EJEMPLO 3F - Construcción de los plásmidos LIMR-36a, LIMR-38a y LIMR-40a que contienen al gen de mutarrotasa de *L. lactis* (LIMR) (aldosa-1-epimerasa) bajo el control de varios promotores y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

Los vectores promiscuos de bajo número de copias P413-GPD, P413-ADH y P413-TEF de *E. coli/S. cerevisiae* (Mumberg *et al.*, 1995) fueron digeridos con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de aldosa-1-epimerasa de *L. lactis* (LIMR) fue liberado del vector 0717050pGA14 (descrito en el ejemplo 1a) por digestión con NheI y XhoI. Los plásmidos linealizados resultantes P413-GPD, P413-ADH y P413-TEF y el fragmento de ADN que codifica para LIMR se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1%, y se aislaron. El plásmido linealizado P413-GPD fue ligado junto con el fragmento LIMR, resultando en el plásmido nombrado como LIMR-36a. Asimismo, el plásmido linealizado P413-ADH fue ligado junto con el fragmento LIMR, resultando en el plásmido nombrado como LIMR-38a. Por último, el plásmido linealizado P413-TEF fue ligado junto con el fragmento LIMR, resultando en el plásmido nombrado como LIMR-40a.

P413-GPD comprende el promotor del gen TDH3 que codifica para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (conocida también como GAPDH), isozima 3; P413-ADH comprende el promotor del gen ADH1 que codifica para alcohol deshidrogenasa I; y P413-TEF comprende el promotor del gen de TEF2 que codifica para el factor de alargamiento EF-1 alfa de la traducción.

EJEMPLO 3G - Construcción de un plásmido de expresión de levadura que contiene al gen de L-arabinosa isomerasa de *L. plantarum* (LpAraA) bajo el control del promotor de GPD y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

El vector promiscuo de alto número de copias P426-GPD de *E. coli/S. cerevisiae* (Mumberg *et al.*, 1995) es digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de L-arabinosa isomerasa de *L. plantarum* (LpAraA) es liberado del vector descrito en el ejemplo 2d, por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P426-GPD y el fragmento de ADN que codifica para LpAraA se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan. Los dos fragmentos de ADN son ligados juntos, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 3H - Construcción de un plásmido de expresión de levadura que contiene al gen de L-ribulocinasa de *L. plantarum* (LpAraB) bajo el control del promotor ADH y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

El vector promiscuo de alto número de copias P425-ADH de *E. coli/S. cerevisiae* (Mumberg *et al.*, 1995) es digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de L-ribulocinasa de *L. plantarum* (LpAraB) es liberado del vector descrito en el ejemplo 2e, por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P425-ADH y el fragmento de ADN que codifica para LpAraB se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan. Los dos fragmentos de ADN son ligados juntos, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 3I - Construcción de un plásmido de expresión de levadura que contiene al gen de L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa de *L. plantarum* (LpAraD) bajo el control del promotor de GPD y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*

El vector promiscuo de alto número de copias P424-GPD de *E. coli/S. cerevisiae* (Mumberg *et al.*, 1995) es digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa de *L. plantarum* (LpAraD) es liberado del vector descrito en el ejemplo 2f, por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P424-GPD y el fragmento de

ADN que codifica para LpAraD se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan. Los dos fragmentos de ADN son ligados juntos, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 3J - Construcción de un plásmido de expresión de levadura que contiene al gen de aldosa-1-epimerasa/UDP galactosa 4-epimerasa bifuncional de *S. cerevisiae* (ScGAL10) bajo el control del promotor ADH y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*, para la sobreexpresión de aldosa-1-epimerasa

El vector promiscuo de bajo número de copias P413-ADH de *E. coli*/*S. cerevisiae* (Mumberg *et al.* (1995) Gene 156, p. 119-122) es digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para el gen de aldosa-1-epimerasa/UDP galactosa 4-epimerasa bifuncional de *S. cerevisiae* (ScGAL10), es liberado del vector ScGAL-a23a (descrito en el ejemplo 2g) por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P413-ADH y el fragmento de ADN que codifica para ScGAL10 se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado P413-ADH es ligado junto con el fragmento ScGAL10, resultando en el plásmido de expresión de levadura.

EJEMPLO 3K - Construcción de un plásmido de expresión de levadura que contiene a la parte de mutarrotasa del gen de aldosa-1-epimerasa/UDP galactosa 4-epimerasa de *S. cerevisiae* (ScGAL10Δ) bajo el control del promotor ADH y el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*, para la sobreexpresión de aldosa-1-epimerasa

El gen GAL10 es conocido por ser una enzima bifuncional que contiene una parte de epimerasa que cataliza la conversión de UDP-galactosa a UDP-glucosa, así como una parte de mutarrotasa que cataliza la conversión de α-galactosa a β-galactosa, y viceversa (Majumdar *et al.*, 2004).

El vector promiscuo de bajo número de copias P413-ADH de *E. coli*/*S. cerevisiae* (Mumberg *et al.* (1995) Gene 156, p. 119-122) es digerido con SpeI y XhoI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el fragmento de ADN que codifica para la parte de mutarrotasa del gen de aldosa-1-epimerasa/UDP galactosa 4-epimerasa bifuncional de *S. cerevisiae* (ScGAL10Δ), es liberado del vector ScGALΔ-a24a (descrito en el ejemplo 2h) por digestión con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P413-ADH y el fragmento de ADN que codifica para ScGAL10Δ se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado P413-ADH es ligado junto con el fragmento ScGAL10Δ, resultando en el plásmido de expresión de levadura.

EJEMPLO 4A - Construcción de cepas de *S. cerevisiae* que contienen a los plásmidos PmXI-8a y PsXKS-14a junto con los plásmidos LMR-36a, LMR-38a, LMR-40a o el plásmido P413-CYC vacío (Mumberg *et al.*, 1995)

200 ng de cada uno de los plásmidos se combinaron y se usaron para la transformación de la cepa de levadura BY4741 de *S. cerevisiae* (Euroscarf, Alemania) por medio de electroporación, usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células de levadura se hicieron competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker, D. M. y Guarente, 1991). La selección para clones transformados con los tres plásmidos se hizo en medio de separación completo sintético sólido omitiendo uracilo, histidina y leucina y complementado con D-glucosa a 2% (SC-Ura, His, Leu) (Rose *et al.*, 1990). Clones primarios de tamaño medio se volvieron a sembrar por estría sobre SC-Ura, His, Leu, y se aisló una colonia de cada una de las siguientes: cepa T0062 transformada con los plásmidos LMR-36a, PmXI-8a y PsXKS-14a; cepa T0063 con los plásmidos LMR-38a, PmXI-8a y PsXKS-14a; cepa T0065 con los plásmidos LMR-40a, PmXI-8a y PsXKS-14a; y finalmente la cepa T0067 con los plásmidos P413-CYC, PmXI-8a y PsXKS-14a (estos plásmidos se describen en el ejemplo 3; P413-CYC es el plásmido vacío descrito en Mumberg *et al.*, 1995).

EJEMPLO 4B - Mediciones del metabolismo de D-xilosa por curvas de crecimiento de las cepas de levadura T0062, T0063, T0065 y T0067

Cambios en la velocidad de metabolismo de D-xilosa se midieron como alteraciones en la velocidad de crecimiento de las cepas de levadura que metabolizan xilosa. Las cuatro cepas fueron adaptadas inicialmente al metabolismo de D-xilosa. Cada cepa fue inoculada individualmente en medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina y leucina complementado con D-xilosa a 2% y D-glucosa a 0.2% (SCX (+ D-glucosa a 0.2%) - Ura, His, Leu). Los cultivos se incubaron por una semana a 30°C en un agitador que corría a 225 RPM. Después de una semana, cada cultivo se usó para re-inocular nuevos cultivos con medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina y leucina complementado con D-xilosa a 2% y D-glucosa a 0.02% (SCX (+ D-glucosa a 0.02%) - Ura, His, Leu). Estos cultivos se incubaron por otra semana como se describió anteriormente. Se iniciaron experimentos de crecimiento por inoculación de SCX-Ura, His, Leu complementado con D-xilosa a 2% a un título de células inicial de DO600 = 0.006/ml. Estos cultivos se incubaron como se describió anteriormente. Se tomaron muestras de alícuotas cuatro veces con intervalos de 24 horas, se midió la densidad óptica DO600, y se determinó una curva de crecimiento para cada una de las cuatro cepas. Se determinó el tiempo de duplicación (es decir, el tiempo transcurrido para una duplicación en el número de microorganismos por ml durante la fase de crecimiento exponencial) usando el intervalo de tiempo de 24 a 96 horas después de la fase de latencia inicial. Pudieron determinarse los siguientes datos de crecimiento para las cuatro cepas:

Cepa de levadura	Velocidad de crecimiento específica ( $\mu\text{h}^{-1}$ )	DO600 final $\text{ml}^{-1}$
T0067	0.058	0.110
T0065	0.070	0.215
T0063	0.079	0.441
T0062	0.088	0.524

Estos resultados muestran un incremento en la velocidad de crecimiento de aproximadamente 20% o más en las cepas cuando la aldosa-1-epimerasa es co-expresada junto con la xilosa isomerasa y D-xilulocinasa, en comparación con la cepa isogénica que no expresa mutarrotasa. Compárense las cepas T0056, T0063 y T0062 con T0067 que no expresa la mutarrotasa.

- 5 En particular, la cepa T0062 mostró un incremento en la velocidad de crecimiento de más de 50%. En términos de carbono asimilado, se logró un incremento en biomasa de más de 4 veces en esa cepa de levadura recombinante. Además, el uso de diferentes promotores que controlan la aldosa-1-epimerasa, en cepas de otra manera isogénicas, demuestra un incremento en el flujo de carbono como resultado de una concentración incrementada del promotor. Esto muestra que existe un cuello de botella antes de la isomerización de la D-xilosa en la vía metabólica del catabolismo de la D-xilosa.

EJEMPLO 5A - Construcción de cepas de *S. cerevisiae* que contienen a los plásmidos ThXI-5a y PsXKS-14a junto con el plásmido LIMR-36a o el plásmido P413-CYC vacío (Mumberg *et al.*, 1995)

- 15 200 ng de cada uno de los plásmidos se combinaron y se usaron para la transformación de la cepa de levadura BY4741 de *S. cerevisiae* (Euroscarf, Alemania) por medio de electroporación, usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células de levadura se hicieron competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker, D. M. y Guarente, 1991). La selección para clones transformados con los tres plásmidos se hizo en medio de separación completo sintético sólido omitiendo uracilo, histidina y leucina y complementado con D-glucosa a 2% (SC-Ura, His, Leu) (Rose *et al.*, 1990). Clones primarios de tamaño medio se volvieron a sembrar por estría sobre SC-Ura, His, Leu, y se aisló una colonia de cada una de las siguientes: cepa T0085 transformada con los plásmidos LIMR-36a, ThXI-5a y PsXKS-14a; y cepa T0086 con los plásmidos P413-CYC, ThXI-5a y PsXKS-14a.

EJEMPLO 5B - Mediciones del metabolismo de D-xilosa por curvas de crecimiento de las cepas de levadura T0085 y T0086

- 25 Cambios en la velocidad de metabolismo de D-xilosa se midieron como alteraciones en la velocidad de crecimiento de las cepas de levadura que metabolizan xilosa. Las dos cepas fueron adaptadas inicialmente al metabolismo de D-xilosa. Cada cepa fue inoculada individualmente en medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina y leucina complementado con D-xilosa a 2% y D-glucosa a 0.2% (SCX (+ D-glucosa a 0.2%) - Ura, His, Leu). Los cultivos se incubaron por una semana a 30°C en un agitador que corría a 225 RPM. Después de una semana, cada cultivo se usó para re-inocular nuevos cultivos con medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina y leucina complementado con D-xilosa a 2% y D-glucosa a 0.02% (SCX (+ D-glucosa a 0.02%) - Ura, His, Leu). Estos cultivos se incubaron por otra semana como se describió anteriormente. Se iniciaron experimentos de crecimiento por inoculación de SCX-Ura, His, Leu complementado con D-xilosa a 2% a un título de células inicial de DO600 = 0.006/ml. Estos cultivos se incubaron como se describió anteriormente. Se tomaron muestras de alícuotas cuatro veces con intervalos de 24 horas, se midió la densidad óptica DO600, y se determinó una curva de crecimiento para cada una de las cuatro cepas. Se determinó el tiempo de duplicación usando el intervalo de tiempo de 24 a 96 horas después de la fase de latencia inicial. Pudieron determinarse los siguientes datos de crecimiento para las dos cepas:

Cepa de levadura	Velocidad de crecimiento específica ( $\mu\text{h}^{-1}$ )	DO600 final $\text{ml}^{-1}$
T0086	0.056	0.101
T0085	0.067	0.172

Esto demuestra que puede lograrse un incremento en la velocidad de crecimiento de aproximadamente 20% cuando la aldosa-1-epimerasa es co-expresada junto con la xilosa isomerasa y D-xilulocinasa, en comparación con la cepa isogénica que no expresa la mutarrotasa. Compárense la cepa T0085 con la cepa T0086 que no expresa la mutarrotasa.

- 40 EJEMPLO 6A - Construcción de cepas de *S. cerevisiae* que contienen al plásmido PsXR-24a (o PsXR-25), el plásmido PsXDH-11a y el plásmido PsXKS-14a junto con el plásmido LIMR-38a, o el plásmido P423-CYC vacío (Mumberg *et al.*, 1995)

- 45 200 ng de cada uno de los plásmidos se combinaron y se usaron para la transformación de la cepa de levadura Y07202 de *S. cerevisiae* (Euroscarf, Alemania) por medio de electroporación, usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células de levadura se hicieron competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker y Guarente, 1991). La selección para clones transformados con los cuatro plásmidos se hizo simultáneamente en medio de separación completo sintético sólido omitiendo uracilo, histidina, leucina y triptófano y complementado con D-glucosa a 2% (SC-Ura, His, Leu, Trp) (Rose *et al.*, 1990). Clones primarios de tamaño medio se volvieron a sembrar por estría sobre SC-Ura, His, Leu, Trp, y se aisló una colonia de cada una de las siguientes: cepa T0114 transformada con los plásmidos LIMR-38a, PsXR-24a, PsXDH-11a y PsXKS-14a; cepa T0117

con los plásmidos P423-CYC, PsXR-24a, PsXDH-11a y PsXKS-14a; cepa T0123 con los plásmidos LIMR-38a, PsXR-25a, PsXDH-11a y PsXKS-14a; y cepa T0126 con los plásmidos P423-CYC, PsXR-25a, PsXDH-11a y PsXKS-14a.

EJEMPLO 6B - Mediciones del metabolismo de D-xilosa por curvas de crecimiento de las cepas de levadura T0114, T0117, T0123 y T0126

5 Cambios en la velocidad de metabolismo de D-xilosa se midieron como alteraciones en la velocidad de crecimiento de las cepas de levadura que metabolizan xilosa. Las cuatro cepas fueron adaptadas inicialmente al metabolismo de D-xilosa. Cada cepa fue inoculada individualmente en medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina, leucina y triptófano complementado con D-xilosa a 2% y D-glucosa a 0.2% (SCX (+ D-glucosa a 0.2%) - Ura, His, Leu, Trp). Los cultivos se incubaron por una semana a 30°C en un agitador que corría a 225 RPM. Después de una  
10 semana, cada cultivo se usó para re-inocular nuevos cultivos con medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina, leucina y triptófano complementado con D-xilosa a 2% y D-glucosa a 0.02% (SCX (+ D-glucosa a 0.02%) - Ura, His, Leu, Trp). Estos cultivos se incubaron por otra semana como se describió anteriormente. Se iniciaron experimentos de crecimiento por inoculación de SCX-Ura, His, Leu, Trp complementado con D-xilosa a 2% a un título de células inicial de DO600 = 0.006/ml. Estos cultivos se incubaron como se describió anteriormente. Se  
15 tomaron muestras de alícuotas cinco veces con intervalos de 24 horas, se midió la densidad óptica DO600, y se determinó una curva de crecimiento para cada una de las cuatro cepas. Se determinó el tiempo de duplicación usando el intervalo de tiempo de 24 a 120 horas después de la fase de latencia inicial. Pudieron determinarse los siguientes datos de crecimiento para las cuatro cepas:

Cepa de levadura	Velocidad de crecimiento específica ( $\mu\text{h}^{-1}$ )	DO600 final $\text{ml}^{-1}$
T0114	0.040	0.089
T0117	0.033	0.055
T0123	0.039	0.084
T0126	0.034	0.059

20 Esto demuestra que puede lograrse un incremento en la velocidad de crecimiento de más de 10% cuando la aldosa-1-epimerasa es co-expresada junto con la xilosa reductasa, xilulosa deshidrogenasa y D-xilulocinasa, en comparación con la cepa isogénica que no expresa la mutarrotasa. Compárese la cepa T0114 con la cepa T0117 que no expresa la mutarrotasa y la cepa T0123 con la cepa T0126 que no expresa la mutarrotasa.

No pudieron medirse diferencias significativas entre las cepas que expresan la xilosa reductasa de *P. stipitis* en un plásmido de alto número de copias (cepa T0114) o un plásmido de bajo número de copias (cepa T0123).

25 EJEMPLO 7A - Construcción de cepas de *S. cerevisiae* que contienen a los plásmidos LpAraA, LpAraB y LpAraD junto con el plásmido LIMR-36a o el plásmido P413-CYC vacío (Mumberg *et al.*, 1995)

200 ng de cada uno de los plásmidos LpAraA, LpAraB y LpAraD (descritos en los ejemplos 3g, 3h y 3i) se combinan con el plásmido LIMR-36a (descrito en el ejemplo 3f) o con el plásmido vacío P413-CYC (Mumberg *et al.*, 1995), y se usan para la transformación de la cepa de levadura Y07202 de *S. cerevisiae* (Euroscarf, Alemania) por medio de  
30 electroporación usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células de levadura se hacen competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker, D. M. y Guarente, 1991). La selección para clones transformados con los cuatro plásmidos se lleva a cabo en medio de separación completo sintético sólido omitiendo uracilo, histidina, leucina y triptófano y complementado con D-glucosa a 2% (SC-Ura, His, Leu, Trp) (Rose *et al.*, 1990). Clones primarios de tamaño medio se vuelven a sembrar por estría en SC-Ura, His, Leu, Trp, y se aísla una colonia de cada una de las cepas de levadura que poseen el gen de aldosa-1-epimerasa (LIMR) o el vector vacío P413-CYC.  
35

EJEMPLO 7B - Mediciones del metabolismo de L-arabinosa por curvas de crecimiento de las cepas de levadura descritas en el ejemplo 7a

40 Cambios en la velocidad de metabolismo de L-arabinosa se midieron como alteraciones en la velocidad de crecimiento de las cepas de levadura que metabolizan arabinosa. Las dos cepas (descritas en el ejemplo 7a) son adaptadas inicialmente al metabolismo de L-arabinosa. Cada cepa es inoculada individualmente en medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina, leucina y triptófano complementado con L-arabinosa a 2% y D-glucosa a 0.2% (SCA (+ D-glucosa a 0.2%) - Ura, His, Leu, Trp). Los cultivos se incuban por una semana a 30°C en un agitador que corre a 225 RPM. Después de una semana, cada cultivo se usa para re-inocular nuevos cultivos con medio de  
45 separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina, leucina y triptófano complementado con L-arabinosa a 2% y D-glucosa a 0.02% (SCA (+ D-glucosa a 0.02%) - Ura, His, Leu, Trp). Estos cultivos se incuban por otra semana como se describió anteriormente. Se inician experimentos de crecimiento por inoculación de SCA-Ura, His, Leu, Trp complementado con L-arabinosa a 2% a un título de células inicial de DO600 = 0.006/ml. Estos cultivos se incuban como se describió anteriormente. Se toman muestras de alícuotas cinco veces con intervalos de 24 horas, se mide la densidad óptica DO600, y se determinan las curvas de crecimiento para cada una de las dos cepas. Se determinan los  
50 tiempos de duplicación usando el intervalo de tiempo de 24 a 120 horas después de la fase de latencia inicial.

Un incremento en la velocidad de crecimiento y en la biomasa acumulada de levaduras se logra cuando la aldosa-1-epimerasa es co-expresada junto con L-arabinosa isomerasa (LpAraA), L-ribulocinasa (LpAraB) y L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa (LpAraD), en comparación con la cepa isogénica que no expresa una mutarrotasa.

EJEMPLO 8A - Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* que contiene a los plásmidos PmXI-8a y PsXKS-14a junto con el plásmido que codifica para ScGAL10 bajo el control del promotor ADH, para la sobreexpresión de aldosa-1-epimerasa

200 ng de cada uno de los tres plásmidos se combinan y se usan para la transformación de la cepa de levadura BY4741 de *S. cerevisiae* (Euroscarf, Alemania) por medio de electroporación usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células de levadura se hacen competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker y Guarente, 1991). La selección para clones transformados con los tres plásmidos se logra en medio de separación completo sintético sólido omitiendo uracilo, histidina y leucina y complementado con D-glucosa a 2% (SC-Ura, His, Leu) (Rose *et. al.*, 1990). Los clones que comprendan los tres plásmidos crecerán en SC-Ura, His, Leu.

EJEMPLO 8B - Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* que contiene a los plásmidos PmXI-8a y PsXKS-14a junto con el plásmido que codifica para ScGAL10Δ bajo el control del promotor ADH, para la sobreexpresión de aldosa-1-epimerasa

200 ng de cada uno de los tres plásmidos se combinan y se usan para la transformación de la cepa de levadura BY4741 de *S. cerevisiae* (Euroscarf, Alemania) por medio de electroporación usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células de levadura se hacen competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker y Guarente, 1991). La selección para clones transformados con los tres plásmidos se logra en medio de separación completo sintético sólido omitiendo uracilo, histidina y leucina y complementado con D-glucosa a 2% (SC-Ura, His, Leu) (Rose *et. al.*, 1990). Los clones que comprendan los tres plásmidos crecerán en SC-Ura, His, Leu.

EJEMPLO 8C - Mediciones del metabolismo de D-xilosa por curvas de crecimiento de las cepas de levadura descritas en los ejemplos 8a y 8b

Cambios en la velocidad de metabolismo de D-xilosa se miden como alteraciones en la velocidad de crecimiento de las cepas de levadura que metabolizan xilosa. Las dos cepas son adaptadas inicialmente a metabolismo de D-xilosa. Primero, por inoculación individual en medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina y leucina complementado con D-xilosa a 2% y D-glucosa a 0.2% (SCX (+ D-glucosa a 0.2%) – Ura, His, Leu), e incubación por una semana a 30°C en un agitador que corre a 225 RPM. Después, cada cultivo se usa para la re-inoculación de nuevos cultivos en medio de separación completo sintético líquido omitiendo uracilo, histidina y leucina complementado con D-xilosa a 2% y D-glucosa a 0.2% (SCX (+ D-glucosa a 0.02%) - Ura, His, Leu). De nuevo, cada cultivo se incuba por una semana a 30°C en un agitador que corre a 225 RPM. Se inician experimentos de crecimiento por inoculación de SCX-Ura, His, Leu complementado con D-xilosa a 2% a un título de células inicial de DO600 = 0.006/ml. La cepa T0067 (transformada con los plásmidos P413-CYC, PmXI-8a y PsXKS-14a), descrita en el ejemplo 4a, puede incluirse en el experimento, sirviendo como un control isogénico para la medición del crecimiento sin el gen ScGAL10 o ScGAL10Δ presente. Cada uno de los tres cultivos se incuba como se describió anteriormente, y se toman muestras de las alícuotas cuatro veces con intervalos de 24 horas. Se mide la densidad óptica DO600 y, con base en eso, se determina la curva de crecimiento para cada cepa. Se determina el tiempo de duplicación, usando el intervalo de tiempo de 24 a 96 horas después de la fase de latencia inicial. El incremento en la velocidad de crecimiento específica y en la biomasa acumulada de levaduras se demuestra en estas dos cepas de levadura que expresan ScGAL10 o ScGAL10Δ, en comparación con la cepa T0067 isogénica no transformada con un derivado de expresión heterólogo de GAL10 de levadura (por ejemplo, ScGAL10 o ScGAL10Δ).

EJEMPLO 9A - Clonación por TOPO de una región de flaqueo izquierda para la integración estable de la construcción de expresión en el locus Rdn1 de levadura (LFR<sub>Rdn1</sub>) basada en el código de acceso del NCBI DQ130086 versión 1

El fragmento de ADN de *S. cerevisiae* que permite la integración estable en la parte RDN37-2 de RDN1 (LFR<sub>Rdn1</sub>), se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae* usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 19 y SEQ.ID.NO. 20. Se introdujo un sitio de restricción para PmeI proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para Sall distal al fragmento de ADN, flanqueando la pieza LFR<sub>Rdn1</sub>. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 20 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1.0%, y se aisló un fragmento de 433 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como Rdn1-L-a15c(+).

EJEMPLO 9B - Clonación por TOPO de una región de flaqueo derecha para la integración estable de la construcción de expresión en el locus Rdn1 de levadura (RFR<sub>Rdn1</sub>) basada en el código de acceso del NCBI DQ130089 versión 1

El fragmento de ADN de *S. cerevisiae* que permite la integración estable en la parte RDN37-2 de RDN1 (RFR<sub>Rdn1</sub>), se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae* usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 21 y SEQ.ID.NO. 22. Se introdujo un sitio de restricción para XhoI proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para PmeI distal al fragmento de ADN, flanqueando la pieza RFR<sub>Rdn1</sub>. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 20 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C

usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1.0%, y se aisló un fragmento de 503 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como Rdn1-R-a16b(+).

EJEMPLO 9C - Clonación por TOPO de una región de flanqueo izquierda para la integración estable de la construcción de expresión en el locus MIG1 de levadura (LFR<sub>Mig1-2</sub>) basada en el código de acceso del NCBI Z72557 versión 1

El fragmento de ADN de *S. cerevisiae* que permite la integración estable en el locus MIG1 (LFR<sub>Mig1-2</sub>), se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae* usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 23 y SEQ.ID.NO. 24. Se introdujo un sitio de restricción para PmeI proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para Sall distal al fragmento de ADN, flanqueando la pieza LFR<sub>Mig1-2</sub>. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 20 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1.0%, y se aisló un fragmento de 507 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como Mig1-L2-a19h(+).

EJEMPLO 9D - Clonación por TOPO de una región de flanqueo derecha para la integración estable de la construcción de expresión en el locus MIG1 de levadura (RFR<sub>Mig1-2</sub>) basada en el código de acceso del NCBI Z72556 versión 1

El fragmento de ADN de *S. cerevisiae* que permite la integración estable en el locus MIG1 (RFR<sub>Mig1-2</sub>), se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae* usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 25 y SEQ.ID.NO. 26. Se introdujo un sitio de restricción para XhoI proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para PmeI distal al fragmento de ADN, flanqueando la pieza RFR<sub>Mig1-2</sub>. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 20 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 1.0%, y se aisló un fragmento de 500 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como Mig1-R2-a20a(-).

EJEMPLO 10A - Construcción de un plásmido integrativo de levadura que contiene a las regiones de flanqueo izquierda y derecha del locus Rdn1 (LFR<sub>Rdn1</sub> + RFR<sub>Rdn1</sub>) de *S. cerevisiae* que permiten recombinación homóloga en el genoma de levadura

El plásmido Rdn1-L-a15c(+) (descrito en el ejemplo 9a) fue digerido con XhoI y PsmOMI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido Rdn1-R-a16b(+) (descrito en el ejemplo 9b) fue digerido con XhoI y NotI. El plásmido linealizado resultante Rdn1-L-a15c(+) y el fragmento de ADN que contiene a RFR<sub>Rdn1</sub> que se origina del plásmido Rdn1-R-a16b(+), se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado Rdn1-L-a15c(+) fue ligado junto con el fragmento de ADN RFR<sub>Rdn1</sub>, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como Rdn1-LR-b5a.

EJEMPLO 10B - Construcción de un plásmido integrativo de levadura que contiene a las regiones de flanqueo izquierda y derecha del locus Mig1 (LFR<sub>Mig1-2</sub> + RFR<sub>Mig1-2</sub>) de *S. cerevisiae* que permiten recombinación homóloga en el genoma de levadura

El plásmido Mig1-L2-a19h(+) (descrito en el ejemplo 9c) fue digerido con NotI y XbaI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido Mig1-R2-a20a(-) (descrito en el ejemplo 9d) fue digerido con SpeI y NotI. El plásmido linealizado resultante Mig1-L2-a19h(+) y el fragmento de ADN que contiene a RFR<sub>Mig1-2</sub> que se origina del plásmido Mig1-R2-a20a(-), se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado Mig1-L2-a19h(+) fue ligado junto con el fragmento de ADN RFR<sub>Mig1-2</sub>, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como Mig1-LR2-b7a.

EJEMPLO 11 - Construcción de cassettes de genes marcadores de antibióticos flanqueados por loxP con el gen *kanMX* o *nat1*

El plásmido pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) fue digerido con XbaI y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, los plásmidos pAG25 (Goldstein y McCusker, 1999) y pUG6 fueron digeridos con SpeI y Sall. El plásmido linealizado resultante pUG6 y los fragmentos de ADN que contienen al gen *nat1* (que se origina del plásmido pAG25) y al gen *kanMX* (que se origina del plásmido pUG6), se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado pUG6 fue ligado junto con el fragmento de ADN que codifica para *nat1*, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. Este plásmido fue nombrado como pUG6R25-b2a. Asimismo, el

plásmido linealizado pUG6 fue ligado junto con el fragmento de ADN que codifica para *kanMX*, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. Este plásmido fue nombrado como pUG6R6-b1a.

EJEMPLO 12A - Construcción de un plásmido integrativo de levadura que contiene a la región de flanco izquierdo del locus Rdn1 (LFR<sub>Rdn1</sub>) de *S. cerevisiae*, el gen marcador de antibióticos *nat1* flanqueado por *loxP* y la región de flanco derecho del locus Rdn1 (RFR<sub>Rdn1</sub>) que permiten recombinación homóloga en el genoma de levadura y selección subsiguiente, usando el antibiótico nourseotricina

El plásmido Rdn1-LR-b5a (descrito en el ejemplo 10a) es digerido con NotI, y los extremos terminales resultantes desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido pUG6R25-b2a (descrito en el ejemplo 11) es digerido con NotI. El plásmido linealizado resultante Rdn1-LR-b5a y el fragmento de ADN que contiene al gen *nat1* flanqueado por *loxP* (que se origina de plásmido pUG6R25-b2a), se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado Rdn1-LR-b5a es ligado junto con el fragmento de ADN del gen *nat1* flanqueado por *loxP*, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 12B - Construcción de un plásmido integrativo de levadura que contiene a la región de flanco izquierdo del locus Mig1 (LFR<sub>Mig1-2</sub>) de *S. cerevisiae*, el gen marcador de antibióticos *kanMX* flanqueado por *loxP* y la región de flanco derecho del locus Mig1 (RFR<sub>Mig1-2</sub>) que permiten recombinación homóloga en el genoma de levadura y selección subsiguiente, usando el antibiótico G418

El plásmido Mig1-LR2-b7a (descrito en el ejemplo 10b) es digerido con NotI, y los extremos terminales resultantes desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido pUG6R6-b1a (descrito en el ejemplo 11) es digerido con NotI. El plásmido linealizado resultante Mig1-LR2-b7a y el fragmento de ADN que contiene al gen *kanMX* flanqueado por *loxP* (que se origina de plásmido pUG6R6-b1a), se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado Mig1-LR2-b7a es ligado junto con el fragmento de ADN del gen *kanMX* flanqueado por *loxP*, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 13A - Clonación por TOPO de un fragmento de ADN que contiene al terminador de transcripción del marco de lectura abierto YBR197C y al promotor del gen *PGI1*, basada en el código de acceso del NCBI Z21487 versión 1

El fragmento de ADN (P-pgi) de *S. cerevisiae* que abarca la región entre el codón de detención del marco de lectura abierto YBR197C y el codón de ATG del gen *PGI1*, se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 27 y SEQ.ID.NO. 28. Se introdujo un sitio de restricción para Sall proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para AvrII distal al fragmento de ADN, flanqueando la región intergénica. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 1318 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-pgi-a1a(+).

EJEMPLO 13B - Clonación por TOPO de un fragmento de ADN que contiene al terminador de transcripción del marco de lectura abierto YDR051C y al promotor del gen *TPI1*, basada en el código de acceso del NCBI Z49209 versión 1

El fragmento de ADN (P-tpi) de *S. cerevisiae* que abarca la región entre el codón de detención del marco de lectura abierto YDR051C y el codón de ATG del gen *TPI1*, se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 29 y SEQ.ID.NO. 30. Se introdujo un sitio de restricción para Sall proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para AvrII distal al fragmento de ADN, flanqueando la región intergénica. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 599 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-tpi-a2d(+).

EJEMPLO 13C - Clonación por TOPO de un fragmento de ADN que contiene al terminador de transcripción del gen *YKU80* y al promotor del gen *PGM2*, basada en el código de acceso del NCBI Z49702 versión 1

El fragmento de ADN (P-pgm) de *S. cerevisiae* que abarca la región entre el codón de detención del gen *YKU80* y el codón de ATG del gen *PGM2*, se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 31 y SEQ.ID.NO. 32. Se introdujo un sitio de restricción para Sall proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para AvrII distal al fragmento de ADN, flanqueando la región intergénica. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%,

y se aisló un fragmento de 710 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-pgm-a10a(+).

EJEMPLO 13D - Clonación por TOPO de un fragmento de ADN que contiene al terminador de transcripción del gen *STU2* y al promotor del gen *PDC1*, basada en el código de acceso del NCBI Z73217 versión 1

El fragmento de ADN (P-pdc) de *S. cerevisiae* que abarca la región entre el codón de detención del gen *STU2* y el codón de ATG del gen *PDC1*, se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 33 y SEQ.ID.NO. 34. Se introdujo un sitio de restricción para Sall proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para AvrII distal al fragmento de ADN, flanqueando la región intergénica. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 971 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-pdc-a9f(+).

EJEMPLO 13E - Clonación por TOPO de un fragmento de ADN que contiene al terminador de transcripción del gen *MPE1* y al promotor del gen *FBA1*, basada en el código de acceso del NCBI Z28060 versión 1

El fragmento de ADN (P-fba) de *S. cerevisiae* que abarca la región entre el codón de detención del gen *MPE1* y el codón de ATG del gen *FBA1*, se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 35 y SEQ.ID.NO. 36. Se introdujo un sitio de restricción para Sall proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para AvrII distal al fragmento de ADN, flanqueando la región intergénica. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 646 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-fba-a7b(+).

EJEMPLO 13F - Clonación por TOPO de un fragmento de ADN que contiene al terminador de transcripción del marco de lectura abierto YKL151C y al promotor del gen *GPM1*, basada en el código de acceso del NCBI Z26877 versión 1

El fragmento de ADN (P-gpm) de *S. cerevisiae* que abarca la región entre el codón de detención del marco de lectura abierto YKL151C y el codón de ATG del gen *GPM1*, se amplificó por PCR a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 37 y SEQ.ID.NO. 38. Se introdujo un sitio de restricción para Sall proximal al fragmento de ADN, y un sitio de restricción para AvrII distal al fragmento de ADN, flanqueando la región intergénica. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 547 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-gpm-a8a(+).

EJEMPLO 14A - Clonación por TOPO del gen *TKL1* de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae* basada en el código de acceso del NCBI X73224 versión 1

Se amplificó por PCR el gen *TKL1* de *S. cerevisiae* (ScTKL1) entero a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 39 y SEQ.ID.NO. 40. Se introdujo un sitio de restricción para XbaI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen ScTKL1. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 90 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 2059 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como ScTKL1-a25a(+).

EJEMPLO 14B - Clonación por TOPO del gen *XKS1* de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae* basada en el código de acceso del NCBI X61377 versión 1

Se amplificó por PCR el gen *XKS1* de *S. cerevisiae* (ScXKS1) entero a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 41 y SEQ.ID.NO. 42. Se introdujo un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal al codón de detención, flanqueando el gen ScXKS1. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de

la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 90 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 2059 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como ScXKS1-G2.

EJEMPLO 14C - Clonación por TOPO del gen *TAL1* incluyendo 187 pb del terminador de transcripción de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae*, basada en el código de acceso del NCBI X15953 versión 1

Se amplificó por PCR el gen *TAL1* de *S. cerevisiae* entero junto con 187 pb de la secuencia del terminador de transcripción (ScTAL1+T) a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 43 y SEQ.ID.NO. 44. Se introdujo un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal a la secuencia del terminador de transcripción, flanqueando el gen ScXKS1+T. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 60 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 1210 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como ScTAL1+T-a22a(+).

EJEMPLO 14D - Clonación por TOPO del gen *RK11* incluyendo 206 pb del terminador de transcripción de la cepa D0002 de *Saccharomyces cerevisiae*, basada en el código de acceso del NCBI X94335 versión 1

Se amplificó por PCR el gen *RK11* de *S. cerevisiae* entero junto con 206 pb de la secuencia del terminador de transcripción (ScRK11+T) a partir de ADN obtenido de la cepa D0002 de *S. cerevisiae*, usando los iniciadores identificados por SEQ.ID.NO. 45 y SEQ.ID.NO. 46. Se introdujo un sitio de restricción para NheI proximal al codón de inicio de ATG, y un sitio de restricción para XhoI distal a la secuencia del terminador de transcripción, flanqueando el gen ScRK11+T. Como molde, se usó ADN de la cepa de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.2 ng/μl de la reacción de PCR. Se llevó a cabo PCR a 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C y 60 segundos a 72°C, seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Finnzymes Oy, Finlandia). El producto de PCR se separó electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aisló un fragmento de 998 pb. El fragmento de ADN fue clonado por TOPO en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como ScRK11+T-a21c(+).

EJEMPLO 15A - Construcción de un plásmido que contiene al cassette de expresión de levadura compuesto del promotor P-pgi frente al gen ScXKS1

El plásmido P-pgi-a1a(+) (descrito en el ejemplo 13a) fue digerido con AvrII y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido ScXKS1-G2 (descrito en el ejemplo 14b) fue digerido con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P-pgi-a1a(+) y el fragmento de ADN que contiene a ScXKS1 que se origina del plásmido ScXKS1-G2, se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado P-pgi-a1a(+) fue ligado junto con el fragmento de ADN que codifica para ScXKS1, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-pgi+ScXKS1-b38a.

EJEMPLO 15B - Construcción de un plásmido que contiene al cassette de expresión de levadura compuesto del promotor P-fba frente al gen PmXI

El plásmido P-fba-a7b(+) (descrito en el ejemplo 13e) fue digerido con AvrII y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido 0717049pGA15 que posee al gen PmXI (descrito en el ejemplo 1b) fue digerido con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P-fba-a7b(+) y el fragmento de ADN que contiene a PmXI que se origina del plásmido 0717049pGA15, se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado P-fba-a7b(+) fue ligado junto con el fragmento de ADN que codifica para PmXI, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-fba+PmXI-b34c.

EJEMPLO 15C - Construcción de un plásmido que contiene al cassette de expresión de levadura compuesto del promotor P-gpm frente al gen ScRK11+T

El plásmido P-gpm-a8a(+) (descrito en el ejemplo 13f) fue digerido con AvrII y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido ScRK11+T-a21c(+) (descrito en el ejemplo 13d) fue digerido con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P-gpm-a8a(+) y el fragmento de ADN que contiene a ScRK11+T que se origina del plásmido ScRK11+T-a21c(+), se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado P-gpm-a8a(+) fue ligado junto con el fragmento de ADN que codifica para ScRK11+T, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-gpm+ScRK11+T-b15a.

EJEMPLO 15D - Construcción de un plásmido que contiene al cassette de expresión de levadura compuesto del promotor P-tpi frente al gen LIMR

El plásmido P-tpi-a2d(+) (descrito en el ejemplo 13b) fue digerido con AvrII y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido 0717050pGA14 (descrito en el ejemplo 1a) fue digerido con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P-tpi-a2d(+) y el fragmento de ADN que contiene a LIMR que se origina del plásmido 0717050pGA14, se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado P-tpi-a2d(+) fue ligado junto con el fragmento de ADN que codifica para LIMR, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-tpi+LIMR-b39a.

EJEMPLO 15E - Construcción de un plásmido que contiene al cassette de expresión de levadura compuesto del promotor P-pgm frente al gen ScTKL1

El plásmido P-pgm-a10a(+) (descrito en el ejemplo 13c) fue digerido con AvrII y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido ScTKL1-a25a(+) (descrito en el ejemplo 14a) fue digerido con XbaI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P-pgm-a10a(+) y el fragmento de ADN que contiene a ScTKL1 que se origina del plásmido ScTKL1-a25a(+), se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado P-pgm-a10a(+) fue ligado junto con el fragmento de ADN que codifica para ScTKL1, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-pgm+ScTKL1-b67a.

EJEMPLO 15F - Construcción de un plásmido que contiene al cassette de expresión de levadura compuesto del promotor P-pdc frente al gen TAL1+T

El plásmido P-pdc-a9f(+) (descrito en el ejemplo 13d) fue digerido con AvrII y XhoI, y los extremos terminales resultantes fueron desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido ScTAL1+T-a22a(+) (descrito en el ejemplo 14c) fue digerido con NheI y XhoI. El plásmido linealizado resultante P-pdc-a9f(+) y el fragmento de ADN que contiene a ScTAL1+T que se origina del plásmido ScTAL1+T-a22a(+), se separaron electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aislaron después. El plásmido linealizado P-pdc-a9f(+) fue ligado junto con el fragmento de ADN que codifica para ScTAL1+T, y el plásmido resultante se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli*. El plásmido fue nombrado como P-pdc+ScTAL1+T-b26a.

EJEMPLO 16A - Construcción de un plásmido con los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgi+ScXKS y P-fba+PmXI

El plásmido pgi+ScXKS1-b38a (descrito en el ejemplo 15a) es digerido con XhoI y ApaI, y los extremos terminales resultantes desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido P-fba+PmXI-b34c (descrito en el ejemplo 15b) es digerido con Sall y ApaI. El plásmido linealizado resultante pgi+ScXKS1-b38a y el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-fba+PmXI que se origina del plásmido P-fba+PmXI-b34c, se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado pgi+ScXKS1-b38a es ligado junto con el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-fba+PmXI, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 16B - Construcción de un plásmido con los cassettes de expresión de levadura concatenados P-tpi+LIMR y P-pgm+ScTKL1

El plásmido P-tpi+LIMR-b39a (descrito en el ejemplo 15d) es digerido con XhoI y ApaI, y los extremos terminales resultantes desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido P-pgm+ScTKL1-b67a (descrito en el ejemplo 15e) es digerido con Sall y ApaI. El plásmido linealizado resultante P-tpi+LIMR-b39a y el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-pgm+ScTKL1 que se origina del plásmido P-pgm+ScTKL1-b67a, se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado P-tpi+LIMR-b39a es ligado junto con el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-pgm+ScTKL1, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 17A - Construcción de un plásmido con los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgi+ScXKS, P-fba-PmXI y P-gpm+ScRKI1+T

El plásmido que contiene a los cassettes de expresión de levadura P-pgi+ScXKS y P-fba+PmXI concatenados (descritos en el ejemplo 16a) es digerido con XhoI y ApaI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido P-gpm+ScRKI1+T-b15a (descrito en el ejemplo 15c) es digerido con Sall y ApaI. El plásmido linealizado resultante que contiene a los cassettes de expresión de levadura P-pgi+ScXKS y P-fba+PmXI concatenados, y el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-gpm+ScRKI1+T que se origina del plásmido P-gpm+ScRKI1+T-b15a, se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado, que contiene a los cassettes de expresión de levadura P-pgi+ScXKS y P-fba+PmXI concatenados, es ligado junto con el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-gpm+ScRKI1+T, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 17B - Construcción de un plásmido con los cassettes de expresión de levadura concatenados P-tpi+LIMR, P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T

5 El plásmido que contiene a los cassettes de expresión de levadura P-tpi+LIMR y P-pgm+ScTKL1 concatenados (descritos en el ejemplo 16b) es digerido con XhoI y ApaI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido P-pdc+ScTAL1+T-b26a (descrito en el ejemplo 15f) es digerido con Sall y ApaI. El plásmido linealizado resultante que contiene a los cassettes de expresión de levadura P-tpi+LIMR y P-pgm+ScTKL1 concatenados, y el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-pdc+ScTAL1+T que se origina del plásmido P-pdc+ScTAL1+T-b26a, se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado, que contiene a los cassettes de expresión de levadura P-tpi+LIMR y P-pgm+ScTKL1 concatenados, es ligado junto con el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-pdc+ScTAL1+T, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 17C - Construcción de un plásmido con los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T

15 El plásmido P-pgm+ScTKL1-b67a (descrito en el ejemplo 15e) es digerido con XhoI y ApaI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. Asimismo, el plásmido P-pdc+ScTAL1+T-b26a (descrito en el ejemplo 15f) es digerido con Sall y ApaI. El plásmido linealizado resultante, P-pgm+ScTKL1-b67a, y el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-pdc+ScTAL1+T que se origina del plásmido P-pdc+ScTAL1+T-b26a, se separan electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aíslan después. El plásmido linealizado, P-pgm+ScTKL1-b67a, es ligado junto con el fragmento de ADN que contiene al cassette de expresión P-pdc+ScTAL1+T, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 18A - Construcción de un plásmido integrativo de levadura que alberga a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T, que permite recombinación homóloga en el locus Rdn1 y selección subsiguiente usando el antibiótico nourseotricina

25 El plásmido integrativo de levadura que permite recombinación homóloga en el locus Rdn1 y selección subsiguiente en medio de crecimiento complementado con nourseotricina (descrito en el ejemplo 12a) es digerido con XhoI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. El plásmido linealizado se separa electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, de aquel del plásmido no cortado, y se aísla después. Asimismo, el plásmido que posee a los cassettes de expresión de levadura P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T concatenados (descritos en el ejemplo 17a), es digerido con XhoI y Sall. El fragmento de los cassettes de expresión de levadura P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T concatenados se separa electroforéticamente de la estructura de base del vector, usando un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aísla después. El plásmido integrativo linealizado es ligado junto con el fragmento de los cassettes de expresión de levadura P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T concatenados, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 18B - Construcción de un plásmido integrativo de levadura que alberga a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-tpi+LIMR, P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T, que permite recombinación homóloga en el locus Mig1 y selección subsiguiente usando el antibiótico G418

40 El plásmido integrativo de levadura que permite recombinación homóloga en el locus Mig1 y selección subsiguiente en medio de crecimiento complementado con G418 (descrito en el ejemplo 12b) es digerido con XhoI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. El plásmido linealizado se separa electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, de aquel del plásmido no cortado, y se aísla después. Asimismo, los cassettes de expresión de levadura P-tpi+LIMR, P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T concatenados (descritos en el ejemplo 17b), es digerido con XhoI y Sall. El fragmento de los cassettes de expresión de levadura P-tpi+LIMR, P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T concatenados se separa electroforéticamente de la estructura de base del vector, usando un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aísla después. El plásmido integrativo linealizado es ligado junto con el fragmento de los cassettes de expresión de levadura P-tpi+LIMR, P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T concatenados, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 18C - Construcción de un plásmido integrativo de levadura que alberga a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T, que permite recombinación homóloga en el locus Mig1 y selección subsiguiente usando el antibiótico G418

55 El plásmido integrativo de levadura que permite recombinación homóloga en el locus Mig1 y selección subsiguiente en medio de crecimiento complementado con G418 (descrito en el ejemplo 12b) es digerido con XhoI, y los extremos terminales resultantes son desfosforilados subsiguientemente con fosfatasa alcalina. El plásmido linealizado se separa electroforéticamente sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, de aquel del plásmido no cortado, y se aísla después. Asimismo, los cassettes de expresión de levadura P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T concatenados (descritos en el ejemplo 17c), es digerido con XhoI y Sall. El fragmento de los cassettes de expresión de levadura P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T concatenados se separa electroforéticamente de la estructura de base del vector, usando un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.7%, y se aísla después. El plásmido integrativo linealizado es

ligado junto con el fragmento de los cassettes de expresión de levadura P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T concatenados, y el plásmido resultante se usa para la transformación de TOP10 de *E. coli*.

EJEMPLO 19 - Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* que contiene a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T por recombinación en el locus Rdn1, y selección subsiguiente usando el antibiótico nourseotricina

Cinco µg del plásmido integrativo que alberga a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T (descritos en el ejemplo 18a) son digeridos con PmeI, y precipitados subsiguientemente usando 2.5 volúmenes de etanol a 96%. Después de que se desecha el líquido, la pella de ADN se lava con etanol a 70%, se seca y se re-disuelve con 5 µl de agua. El plásmido digerido re-disuelto se usa para la transformación de la cepa BY4741 de la levadura *S. cerevisiae* (Euroscarf, Alemania) por medio de electroporación usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células de levadura se hacen competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker y Guarente, 1991). La selección para clones transformados establemente con los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T, se lleva a cabo por siembra en medio de crecimiento sólido YPD complementado con 100 mg/L de ClonNAT (Werner BioAgents, Jena, Alemania). Antes de la siembra, se deja que las células transformadas crezcan en YPD líquido a 30°C por 4 horas. Después de la siembra en medio selectivo, las placas se incuban a 30°C por 3 días, se aísla una colonia de tamaño medio y se vuelve a sembrar por estría en YPD sólido complementado con 100 mg/L de ClonNAT, y se aísla subsiguientemente un clon.

EJEMPLO 20A - Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* que contiene a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T, incluyendo los cassettes de expresión de levadura concatenados P-tpi+LIMR, P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T por recombinación en el locus Mig1, y selección subsiguiente usando el antibiótico G418

Cinco µg del plásmido integrativo que alberga a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-tpi+LIMR, P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T (descritos en el ejemplo 18b) son digeridos con PmeI, y precipitados subsiguientemente usando 2.5 volúmenes de etanol a 96%. Después de que se desecha el líquido, la pella de ADN se lava con etanol a 70%, se seca y se re-disuelve con 5 µl de agua. El plásmido digerido re-disuelto se usa para la transformación de la cepa de la levadura *S. cerevisiae* descrita en el ejemplo 19 por medio de electroporación usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células de levadura se hacen competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker y Guarente, 1991). La selección para clones transformados establemente con los cassettes de expresión de levadura concatenados P-tpi+LIMR, P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T, se lleva a cabo por siembra en medio de crecimiento sólido YPD complementado con 200 mg/L de geneticina (Life Technologies). Antes de la siembra, se deja que las células transformadas crezcan en YPD líquido a 30°C por 4 horas. Después de la siembra en medio selectivo, las placas se incuban a 30°C por 3 días, se aísla una colonia de tamaño medio y se vuelve a sembrar por estría en YPD sólido complementado con 200 mg/L de geneticina, y se aísla subsiguientemente un clon.

EJEMPLO 20B - Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* que contiene a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgi+ScXKS, P-fba+PmXI y P-gpm+ScRKI1+T, incluyendo los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T por recombinación en el locus Mig1, y selección subsiguiente usando el antibiótico G418

Cinco µg del plásmido integrativo que alberga a los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T (descritos en el ejemplo 18c) son digeridos con PmeI, y precipitados subsiguientemente usando 2.5 volúmenes de etanol a 96%. Después de que se desecha el líquido, la pella de ADN se lava con etanol a 70%, se seca y se re-disuelve con 5 µl de agua. El plásmido digerido re-disuelto se usa para la transformación de la cepa de la levadura *S. cerevisiae* descrita en el ejemplo 19 por medio de electroporación usando el sistema Gene Pulser II de Biorad (Biorad, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células de levadura se hacen competentes de acuerdo con un protocolo estándar (Becker y Guarente, 1991). La selección para clones transformados establemente con los cassettes de expresión de levadura concatenados P-pgm+ScTKL1 y P-pdc+ScTAL1+T, se lleva a cabo por siembra en medio de crecimiento sólido YPD complementado con 200 mg/L de geneticina (Life Technologies). Antes de la siembra, se deja que las células transformadas crezcan en YPD líquido a 30°C por 4 horas. Después de la siembra en medio selectivo, las placas se incuban a 30°C por 3 días, se aísla una colonia de tamaño medio y se vuelve a sembrar por estría en YPD sólido complementado con 200 mg/L de geneticina, y se aísla subsiguientemente un clon.

EJEMPLO 21A - Mediciones del metabolismo de D-xilosa por curvas de crecimiento de las cepas de levadura descritas en los ejemplos 20a y 20b

Los cambios en la velocidad de metabolismo de D-xilosa se miden como alteraciones en la velocidad de crecimiento de las cepas de levadura que metabolizan xilosa. Las dos cepas de levadura (descritas en los ejemplos 20a y 20b) son adaptadas inicialmente a metabolismo de D-xilosa. Cada cepa es inoculada individualmente en medio líquido de peptona xilosa de levadura (YPX) complementado con glucosa a 0.2%. Los cultivos se incuban por una semana a 30°C en un agitador que corre a 225 RPM. Después de una semana, cada cultivo se usa para re-inocular nuevos cultivos con YPX complementado con glucosa a 0.02%. Los dos cultivos se incuban por otra semana como se describió anteriormente. Se inician experimentos de crecimiento por inoculación de YPX a un título de células inicial de DO600 = 0.006/ml. Los cultivos se incuban como se describió anteriormente. Se toman muestras de alícuotas cinco veces con

intervalos de 24 horas, se mide la densidad óptica DO600, y se determinan las curvas de crecimiento para las dos cepas. Se determinan los tiempos de duplicación, usando el intervalo de tiempo de 24 a 120 horas después de la fase de latencia inicial. Se demuestra una velocidad de crecimiento incrementada de la cepa que expresa la aldosa-1-epimerasa (LIMR) junto con la xilosa isomerasa (PmXI), la D-xilulocinasa (ScXKS), la ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa (ScRKI1+T), la transcetolasa (ScTKL1) y la transaldolasa (ScTAL1+T), en comparación con la cepa análoga que no expresa la mutarrotasa.

EJEMPLO 21B - Mediciones de la fermentación de D-xilosa de las cepas de levadura descritas en los ejemplos 20a y 20b

Las dos cepas de levadura adaptadas para metabolismo de D-xilosa (descritas en el ejemplo 21a) son inoculadas individualmente en medio líquido de peptona xilosa de levadura (YPX), usando matraces de agitación inclinados. Los cultivos se incuban a 30°C en un agitador que corre a 225 RPM hasta DO600 ≈ 1.0. Después, los cultivos se cosechan por centrifugación, y se resuspenden en 20 ml de medio líquido de peptona de levadura complementado con 50 g/L de D-xilosa, usando un matraz de agitación con dos cuellos laterales, a una concentración de células final de DO600 = 5. Los matraces de agitación se sellan con tapones que contienen seguros de fermentación insertados. Los cuellos laterales se adaptan con tapones de caucho resellables impermeables a gases. Se lleva a cabo la fermentación a 30°C en un agitador que corre a 100 RPM. Se toman muestras, a través de los tapones de caucho resellables, usando una aguja hipodérmica y jeringa, y se ajustan a pH = 9.0 usando NaOH 2 M. Se miden las concentraciones de etanol usando el kit de prueba de etanol Megazyme: K-ETOH (Megazyme International, Irlanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y con diluciones adecuadas de las muestras. Se determina el progreso de la fermentación para cada una de las dos cepas graficando la concentración de etanol como una función del tiempo. Las velocidades son dadas por la pendiente de la parte lineal de la curva, subsiguiente al cambio diáxico inicial entre el crecimiento aeróbico y la fermentación anaeróbica. Se demuestra una velocidad de fermentación más rápida de la cepa que expresa la aldosa-1-epimerasa, en comparación con la cepa congénica sin este gen.

REFERENCIAS

- Anderson R. L. y Allison D. P. (1965) Purification and Characterization of D-Lyxose Isomerase. *J. Biol. Chem.* 240, 2367-2372.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D., Seidman J. G., Smith J. A. y Struhl K., eds. (1995 (y suplementos periódicos)) *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulos 9, 13 y 16. John Wiley & Sons, New York, N. Y.
- Bailey J. M., Fishman P. H. y Pentchev P. G. (1969) Studies on Mutarotases. III. Isolation and characterization of a mutarotase from bovine kidney cortex. *J. Biol. Chem.* 244, 781-788.
- Becker D. M. y Guarente L. (1991) High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.* 194, 182-187.
- Brahma A. y Bhattacharyya D. (2004) UDP-galactose 4-epimerase from *Kluyveromyces fragilis*. Evidence for independent mutarotation site. *Eur. J. Biochem.* 271, 58-68.
- Burnett M. E., Liu J. y Conway T. (1992) Molecular Characterization of the *Zymomonas mobilis* Enolase (eno) Gene. *J. Bact.* 174, 6548-6553.
- Cheng H., Jiang N., Shen A. y Feng Y. (2005) Molecular cloning and functional expression of D-arabitol dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 35-42.
- Conway T., Sewell G. W. e Ingram L. O. (1987) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene from *Zymomonas mobilis*: Cloning, Sequencing, and Identification of Promoter Region. *J. Bact.* 169, 5653-5662.
- Dische Z. y Borenfreund E. (1951) A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* 192, 583.
- Dothie J. M., Giglio J. R., Moore C. B., Taylor S. S. y Hartley B. S. (1985) Ribitol dehydrogenase of *Klebsiella aerogenes*. Sequence and properties of wild-type and mutant strains. *Biochem. J.* 230, 569-578.
- Eberts T. J., Sample R. H. B., Glick M. R. y Gregory H. E. (1979) A Simplified, Colorimetric Micromethod for Xylose in Serum or Urine, with Phloroglucinol. *Clin. Chem.* 25, 1440-1443.
- Gait M. J., ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- Goldstein A. L. y McCusker J. H. (1999) Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553.
- Güldener U., Heck S., Fiedler T., Beinbauer J. y Hegemann J. H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 2519-2524.
- Izumori K., Rees A. W. y Elbein A. D. (1975) Purification, Crystallization, and Properties of D-Ribose Isomerase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* 250, 8085-8087.
- Kavanagh K., Klimcek M., Nidetsky B. y Wilson D. K. (2003) Structure of xylose reductase bound to NAD<sup>+</sup> and the basis for single and dual co-substrate specificity in family 2 aldo-keto reductases. *Biochem. J.* 373, 319-326.

- Lilley D. M. J. y Dahlberg J. E., eds. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Vol. 211. Academic Press.
- Majumdar S., Ghatak J., Mukherji S., Bhattacharjee H. y Bhaduri A. (2004) UDPgalactose 4- epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*: A bifunctional enzyme with aldose 1-epimerase activity. *Eur. J. Biochem.* 271, 753-759.
- 5 Mumberg D., Mailer R. y Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.
- Nakamura Y., Gojobori T. e Ikemura T. (2000) Codon Usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 28, 292.
- 10 Richard P., Londesborough J., Putkonen M., Kalkkinen N. y Penttila M. (2001) Cloning and Expression of a Fungal L-Arabinitol 4-Dehydrogenase Gene. *J. Biol. Chem.* 276, 40631-40637.
- Roe B., Crabtree J. y Kahn A., eds. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*. John Wiley & Sons.
- Rose M. D., Winston F. y Hieter P., eds. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 15 Ryu K. S., Kim C., Kim I., Yoo S., Choi B. S. y Park C. (2004) NMR Application Probes a Novel and Ubiquitous Family of Enzymes That Alter Monosaccharide Configuration. *J. Biol. Chem.* 279, 25544-25548.
- Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shimonishi T. e Izumori K. (1996) A new enzyme, L-ribose isomerase from *Acinetobacter* sp. strain DL-28. *J. Ferment. Bioeng.* 81, 493-497.
- 20 Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttila M. y Richard P. (2004) A Novel NADH-linked L-Xylulose Reductase in the L-Arabinose Catabolic Pathway of Yeast. *J. Biol. Chem.* 279, 14746-14751.
- Witteveen C. F. B., Weber F., Busink R. y Visser J. (1994) Isolation and characterisation of two xylitol dehydrogenases from *Aspergillus niger*. *Microbiol.* 140, 1679-1685.
- 25 Woodyer R., Simurdiak M., van der Donk W. A. y Zhao H. (2005) Heterologous Expression, Purification, and Characterization of a Highly Active Xylose Reductase from *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1642-1647.
- Yanase H., Sato D., Yamamoto K., Matsuda S., Yamamoto S. y Okamoto K. (2007) Genetic Engineering of *Zymobacter palmae* for Production of Ethanol from Xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2592-2599.

# ES 2 587 836 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

>SEQ.ID.NO. 1 (AAD20245 versión 1):

La secuencia de aminoácidos codificada por esta secuencia de nucleótidos se muestra como SEQ ID No 47.

1 GAATTCCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGGAGCTAGCC

```

      M  A  T  F  T  I  S  K  E  S  L  P  F  R  A  D
49  ATG GCT ACT TTT ACA ATC AGC AAG GAG AGC CTG CCA TTC AGA GCA GAT

      K  S  I  S  Q  I  T  L  S  N  E  R  L  T  I  V
97  AAA TCA ATT TCC CAA ATT ACT TTG TCA AAT GAA AGA TTA ACA ATC GTC

      V  H  D  Y  G  A  R  A  H  Q  L  L  T  P  D  K
145 GTA CAC GAC TAT GGA GCT AGA GCC CAC CAG CTG TTG ACA CCT GAC AAA

      N  G  T  F  E  N  I  L  L  S  K  N  D  S  E  T
193 AAC GGT ACA TTT GAA AAC ATC TTG TTG TCC AAG AAT GAT TCT GAA ACT

      Y  A  N  D  G  G  Y  Y  G  V  I  C  G  P  V  A
241 TAT GCA AAT GAT GGC GGC TAT TAT GGT GTT ATT TGT GGT CCT GTT GCT

      G  R  I  S  G  A  T  Y  D  S  V  S  L  E  A  N
289 GGC AGA ATA TCT GGA GCT ACT TAT GAC TCA GTG AGC TTA GAA GCC AAC

      E  G  K  N  N  L  H  S  G  S  H  G  W  E  R  Q
337 GAG GGC AAA AAT AAC TTA CAT TCA GGC TCA CAC GGT TGG GAA AGA CAA

      F  W  S  Y  E  T  F  E  T  A  S  S  L  G  I  K
385 TTT TGG AGC TAT GAG ACA TTT GAG ACT GCT TCT TCA TTG GGA ATA AAA

      L  S  L  R  D  E  E  S  G  F  P  G  Q  I  Q  A
433 CTG TCA TTG AGA GAC GAA GAA TCT GGT TTT CCA GGC CAG ATT CAA GCA

      E  V  T  Y  K  L  T  D  N  K  L  E  V  T  I  S
481 GAA GTA ACC TAC AAA TTA ACC GAT AAT AAA CTG GAA GTA ACA ATA AGC

      G  L  S  V  T  D  T  V  F  N  P  A  W  H  P  Y
529 GGA TTA TCA GTT ACT GAT ACT GTT TTT AAT CCT GCC TGG CAC CCT TAT
```

ES 2 587 836 T3

F N L S A E L S T T H E H F I Q  
577 TTC AAT CTT AGC GCA GAA CTT AGC ACC ACT CAC GAA CAC TTC ATA CAA

A N V D F L V E T N Q E N I P T  
625 GCC AAC GTG GAC TTT TTA GTA GAA ACC AAT CAG GAG AAC ATC CCT ACC

G R L L T V D D S S Y S I K E S  
673 GGA AGA CTG CTT ACT GTT GAT GAT TCA AGC TAT TCT ATT AAA GAA AGC

V S I K K L L K D N P E G L D D  
721 GTC TCC ATT AAG AAG TTG TTG AAG GAT AAC CCA GAA GGT TTG GAC GAT

C F V F N P K G D K S L M L Y D  
769 TGC TTT GTT TTC AAT CCA AAA GGA GAC AAA TCC CTT ATG TTA TAC GAT

P L S G R K L V A Q T D R Q A V  
817 CCA CTG AGC GGT AGA AAA TTG GTT GCA CAA ACT GAT CGT CAA GCC GTC

V I Y T A T N P E I E S M I N G  
865 GTT ATT TAC ACC GCA ACG AAC CCA GAG ATT GAA TCA ATG ATA AAT GGT

R P M S K N R G I A I E F Q E I  
913 AGA CCT ATG TCC AAA AAT AGA GGC ATA GCC ATT GAG TTT CAA GAA ATC

P D L V H H P E W G T I E L K A  
961 CCG GAT CTT GTT CAC CAC CCA GAA TGG GGA ACC ATT GAA TTG AAA GCT

G Q K K T F I T E Y L F T T N \*  
1009 GGC CAA AAG AAA ACT TTT ATC ACT GAG TAT TTG TTC ACC ACT AAC TAG

1057 CCTAGGCTCGAGGAATTC

>SEQ.ID.NO. 2:

La secuencia de aminoácidos codificada por esta secuencia de nucleótidos se muestra como SEQ ID No 48.

1 GAATTCCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGGAGCTAGCC

M A K E Y F P Q I Q K I K F E G

49 ATG GCC AAA GAA TAC TTT CCA CAA ATA CAG AAG ATT AAG TTT GAA GGC

ES 2 587 836 T3

K D S K N P L A F H Y Y D A E K  
 97 AAA GAT TCA AAG AAT CCA CTG GCC TTC CAT TAT TAT GAT GCA GAA AAG  
  
 E V M G K K M K D W L R F A M A  
 145 GAA GTG ATG GGT AAG AAA ATG AAA GAC TGG CTG AGA TTC GCT ATG GCT  
  
 W W H T L C A E G A D Q F G G G  
 193 TGG TGG CAT ACC TTA TGT GCT GAA GGT GCA GAT CAA TTC GGT GGC GGT  
  
 T K S F P W N E G T D A I E I A  
 241 ACG AAG AGC TTT CCT TGG AAT GAG GGT ACT GAT GCA ATA GAA ATA GCA  
  
 K Q K V D A G F E I M Q K L G I  
 289 AAA CAA AAG GTT GAC GCA GGC TTT GAG ATT ATG CAA AAG CTG GGT ATT  
  
 P Y Y C F H D V D L V S E G N S  
 337 CCT TAT TAT TGT TTT CAT GAC GTG GAC TTG GTA TCC GAA GGA AAT AGC  
  
 I E E Y E S N L K A V V A Y L K  
 385 ATC GAA GAG TAC GAA AGC AAT CTG AAG GCT GTC GTT GCA TAT CTG AAG  
  
 E K Q K E T G I K L L W S T A N  
 433 GAG AAG CAA AAG GAA ACG GGT ATA AAG TTG TTA TGG TCA ACA GCA AAT  
  
 V F G H K R Y M N G A S T N P D  
 481 GTC TTC GGT CAT AAA AGA TAC ATG AAC GGT GCC TCA ACA AAC CCA GAC  
  
 F D V V A R A I V Q I K N A I D  
 529 TTT GAC GTT GTG GCA CGT GCA ATA GTT CAA ATT AAG AAC GCT ATC GAT  
  
 A G I E L G A E N Y V F W G G R  
 577 GCT GGC ATA GAG TTG GGC GCC GAG AAT TAC GTT TTC TGG GGT GGC CGT  
  
 E G Y M S L L N T D Q K R E K E  
 625 GAG GGT TAT ATG AGC CTT TTA AAT ACG GAT CAA AAA CGT GAG AAG GAA  
  
 H M A T M L T M A R D Y A R S K  
 673 CAC ATG GCT ACA ATG CTT ACG ATG GCC CGT GAC TAT GCT AGA TCA AAA

ES 2 587 836 T3

G F K G T F L I E P K P M E P T  
 721 GGT TTT AAG GGT ACA TTC TTG ATA GAA CCT AAA CCG ATG GAA CCA ACA  
  
 K H Q Y D V D T E T A I G F L K  
 769 AAG CAC CAA TAT GAT GTA GAT ACC GAA ACC GCA ATT GGA TTT TTG AAG  
  
 A H N L D K D F K V N I E V N H  
 817 GCA CAT AAC TTG GAC AAG GAT TTC AAG GTA AAC ATA GAA GTA AAT CAT  
  
 A T L A G H T F E H E L A C A V  
 865 GCA ACG TTG GCA GGT CAT ACT TTC GAA CAC GAA TTA GCT TGC GCA GTA  
  
 D A G M L G S I D A N R G D Y Q  
 913 GAT GCT GGA ATG TTA GGT AGC ATC GAT GCA AAT AGA GGT GAT TAC CAG  
  
 N G W D T D Q F P I D Q Y E L V  
 961 AAT GGC TGG GAT ACT GAT CAA TTC CCA ATA GAC CAG TAT GAA CTG GTA  
  
 Q A W M E I I R G G G F V T G G  
 1009 CAG GCC TGG ATG GAA ATA ATC CGT GGC GGT GGT TTC GTG ACA GGT GGA  
  
 T N F D A K T R R N S T D L E D  
 1057 ACA AAT TTT GAT GCA AAA ACT CGT AGA AAC TCA ACT GAT CTT GAG GAT  
  
 I I I A H V S G M D A M A R A L  
 1105 ATC ATT ATC GCT CAC GTA TCT GGC ATG GAC GCT ATG GCC CGT GCA TTG  
  
 E N A A K L L Q E S P Y T K M K  
 1153 GAG AAC GCT GCT AAG CTT TTA CAA GAG TCC CCA TAT ACG AAG ATG AAG  
  
 K E R Y A S F D S G I G K D F E  
 1201 AAA GAG AGA TAT GCT TCT TTT GAT AGC GGT ATA GGA AAA GAC TTC GAG  
  
 D G K L T L E Q V Y E Y G K K N  
 1249 GAT GGA AAG CTG ACA CTG GAG CAA GTG TAC GAA TAT GGT AAA AAG AAT  
  
 G E P K Q T S G K Q E L Y E A I  
 1297 GGT GAA CCA AAA CAG ACC TCA GGA AAG CAG GAA TTA TAT GAA GCC ATT

ES 2 587 836 T3

V A M Y Q \*

1345 GTG GCT ATG TAC CAA TAG CCTAGGCTCGAGGAATTC

>SEQ.ID.NO. 3:

La secuencia de aminoácidos codificada por esta secuencia de nucleótidos se muestra como SEQ ID No 49.

1 GAATTCCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGGAGCTAGCC

M E Y F K N V P Q I K Y E G P K  
49 ATG GAA TAT TTC AAA AAC GTG CCA CAG ATC AAG TAT GAA GGT CCT AAA

S N N P Y A F K F Y N P D E I I  
97 AGC AAT AAC CCT TAT GCA TTT AAG TTC TAT AAC CCA GAT GAA ATT ATA

D G K P L K E H L R F S V A Y W  
145 GAT GGA AAA CCA TTA AAA GAA CAC TTA AGA TTT AGC GTA GCC TAC TGG

H T F T A N G T D P F G A P T M  
193 CAT ACA TTT ACC GCT AAC GGA ACG GAT CCA TTT GGT GCA CCG ACT ATG

Q R P W D H F T D P M D I A K A  
241 CAG CGT CCT TGG GAT CAT TTT ACC GAC CCT ATG GAC ATA GCA AAA GCA

R V E A A F E L F E K L D V P F  
289 CGT GTG GAA GCC GCA TTC GAG CTT TTT GAA AAA TTG GAT GTT CCA TTC

F C F H D R D I A P E G E T L R  
337 TTC TGT TTT CAT GAC AGA GAT ATA GCT CCG GAA GGT GAA ACA TTG AGA

E T N K N L D T I V A M I K D Y  
385 GAA ACC AAC AAA AAC TTA GAT ACT ATC GTT GCT ATG ATT AAA GAC TAC

L K T S K T K V L W G T A N L F  
433 TTA AAA ACG TCA AAG ACT AAA GTT CTT TGG GGC ACT GCT AAT TTG TTT

S N P R F V H G A A T S C N A D  
481 TCT AAT CCA CGT TTC GTG CAT GGC GCT GCC ACA TCA TGT AAT GCA GAC

ES 2 587 836 T3

V F A Y A A A Q V K K A L E I T  
 529 GTA TTT GCT TAT GCA GCC GCT CAA GTT AAA AAG GCC TTA GAG ATT ACC  
  
 K E L G G Q N Y V F W G G R E G  
 577 AAA GAG TTA GGA GGC CAG AAT TAT GTT TTC TGG GGT GGT CGT GAG GGA  
  
 Y E T L L N T D M E L E L D N L  
 625 TAT GAG ACA CTT TTA AAT ACT GAT ATG GAG TTG GAA TTA GAT AAT TTA  
  
 A R F L H M A V E Y A Q E I G F  
 673 GCA AGA TTC TTA CAC ATG GCA GTA GAA TAT GCT CAG GAA ATT GGT TTT  
  
 E G Q F L I E P K P K E P T K H  
 721 GAA GGA CAG TTC TTG ATC GAG CCT AAA CCA AAG GAA CCA ACA AAG CAT  
  
 Q Y D F D A A S V H A F L K K Y  
 769 CAG TAT GAT TTC GAC GCT GCT TCT GTA CAC GCC TTT TTG AAG AAG TAT  
  
 D L D K Y F K L N I E A N H A T  
 817 GAT TTG GAT AAA TAC TTT AAG TTG AAC ATA GAG GCT AAT CAC GCA ACG  
  
 L A G H D F Q H E L R Y A R I N  
 865 TTG GCA GGT CAC GAT TTT CAA CAC GAA TTG AGA TAC GCC CGT ATT AAT  
  
 N M L G S I D A N M G D M L L G  
 913 AAC ATG TTA GGT TCC ATA GAT GCC AAC ATG GGT GAC ATG TTG CTG GGT  
  
 W D T D Q Y P T D I R M T T L A  
 961 TGG GAT ACT GAT CAA TAC CCA ACG GAT ATT AGA ATG ACA ACT TTA GCA  
  
 M Y E V I K M G G F N K G G L N  
 1009 ATG TAC GAG GTC ATT AAA ATG GGA GGT TTT AAC AAA GGA GGT TTG AAT  
  
 F D A K V R R A S F E P E D L F  
 1057 TTC GAT GCT AAA GTG CGT CGT GCC TCT TTT GAA CCT GAA GAC CTT TTT  
  
 L G H I A G M D A F A K G F K V  
 1105 CTT GGA CAT ATT GCC GGA ATG GAT GCA TTT GCA AAA GGT TTC AAG GTC

ES 2 587 836 T3

A Y K L V K D G V F D R F I E E  
 1153 GCT TAT AAG CTT GTT AAG GAT GGT GTA TTT GAT AGA TTC ATT GAA GAG

R Y K S Y R E G I G A E I V S G  
 1201 AGA TAC AAA TCC TAT CGT GAA GGT ATA GGT GCT GAA ATC GTT TCA GGT

K A N F K T L E E Y A L N N P K  
 1249 AAG GCC AAT TTT AAG ACT TTA GAG GAA TAT GCA TTG AAT AAC CCA AAA

I E N K S G K Q E L L E S I L N  
 1297 ATC GAA AAC AAA AGC GGT AAA CAG GAA CTG CTG GAA TCT ATT TTG AAT

Q Y L F S E \*  
 1345 CAA TAT TTG TTC TCT GAA TAG CCTAGGCTCGAGGAATTC

>SEQ.ID.NO. 4:

1 GCTAGCCATG GCCACTACCC CATTGATGC TCCAGATAAG

>SEQ.ID.NO. 5:

1 CTCGAGCCTA GGCTAGTGTT TCAATTCACT TTCCATCTTG GCC

>SEQ.ID.NO. 6:

1 GCTAGCCATG GCTTCTATTA AGTTGAACTC TGGTTACG

>SEQ.ID.NO. 7:

1 CTCGAGCCTA GGCTAGACGA AGATAGGAAT CTGTGCCAG TCCC

>SEQ.ID.NO. 8:

1 GCTAGCCATG GCTGCTAACC CTTCCTTGGT GTTG

>SEQ.ID.NO. 9:

1 CTCGAGCCTA GGCTACTCAG GGCCGTCAAT GAGACACTTG ACAGCACCC

>SEQ.ID.NO. 10:

1 TAGCTAGCAT GTTATCAGTA CCTGATTATG AG

>SEQ.ID.NO. 11:

1 ATCTCGAGTT ACTTTAAGAA TGCCTTAGTC ATGCC

>SEQ.ID.NO. 12:

1 TAGCTAGCAT GAATTTAGTT GAAACAGCCC AAGC

>SEQ.ID.NO. 13:

1 ATCTCGAGCT AATATTTGAT TGCTTGCCCA GCC

>SEQ.ID.NO. 14:

1 TAGCTAGCAT GCTAGAAGCA TTAAAACAAG AAG  
 >SEQ.ID.NO. 15:  
 1 ATCTCGAGTT ACTTGCGAAC TGCATGATCC TTAG  
 >SEQ.ID.NO. 16:  
 1 TAGCTAGCAT GACAGCTCAG TTACAAAGTG AAAG  
 >SEQ.ID.NO. 17:  
 1 ATCTCGAGTC AGGAAAATCT GTAGACAATC TTGG  
 >SEQ.ID.NO. 18:  
 1 TAGCTAGCAT GGCCAGATTT TCCGCTGAAG ATATGCG  
 >SEQ.ID.NO. 19:  
 1 TAGTTTAAAC TTGCCATCAT CATTCCCTAG AAAC TGC  
 >SEQ.ID.NO. 20:  
 1 TAGTCGACAG TGTGTAAGAG TGTACCATTT ACT  
 >SEQ.ID.NO. 21:  
 1 TACTCGAGTT TCCCTTTTTC TGCCTTTTTC GGTG  
 >SEQ.ID.NO. 22:  
 1 TAGTTTAAAC TGATGGTGIG GAAGACATAG ATGG  
 >SEQ.ID.NO. 23:  
 1 TAGTTTAAAC AGTTATGTTT AAAAAATCAA CTTTCTTTCC  
 >SEQ.ID.NO. 24:  
 1 TAGTCGACAA CCAGGTCCTT GTGTGCCGCT GTT  
 >SEQ.ID.NO. 25:  
 1 TACTCGAGTC CTATCGAGTT AACTGCTAG TG  
 >SEQ.ID.NO. 26:  
 1 TAGTTTAAAC ATTGCTTAGC ATAGCTGCCA CTAACC  
 >SEQ.ID.NO. 27:  
 1 TAGTCGACTG ACATGTATGG GTTGAAAATA TTTAG  
 >SEQ.ID.NO. 28:  
 1 TACCTAGGTT TTAGGCTGGT ATCTTGATTC  
 >SEQ.ID.NO. 29:  
 1 TAGTCGACTG TTTAAAGATT ACGGATATTT AAC  
 >SEQ.ID.NO. 30:  
 1 TACCTAGGTT TTAGTTTATG TATGTGTTTT TTGTAG  
 >SEQ.ID.NO. 31:  
 1 TAGTCGACAA AAGGTCTAAC ATCCTTTGAG TTATG  
 >SEQ.ID.NO. 32:

1 TACCTAGGGT TATGTTAACT TTTGTTACTT  
 >SEQ.ID.NO. 33:  
 1 TAGTCGACAG GGTAGCCTCC CCATAACATA AAC  
 >SEQ.ID.NO. 34:  
 1 TACCTAGGTT TGATTGATTT GACTGTGTTA TTTTGCG  
 >SEQ.ID.NO. 35:  
 1 TAGTCGACAT AACAATACTG ACAGTACTAA A  
 >SEQ.ID.NO. 36:  
 1 TACCTAGGTT TGAATATGTA TTACTIONTGGTT ATGG  
 >SEQ.ID.NO. 37:  
 1 TAGTCGACCA CATGCAGTGA TGCACGCGCG  
 >SEQ.ID.NO. 38:  
 1 TACCTAGGTA TTGTAATATG TGTGTTTGTGTT TGG  
 >SEQ.ID.NO. 39:  
 1 TATCTAGAAT GACTCAATTC ACTGACATTG ATAAGC  
 >SEQ.ID.NO. 40:  
 1 TACTCGAGTT AGAAAGCTTT TTTCAAAGGA GAAATTAGC  
 >SEQ.ID.NO. 41:  
 1 TAGCTAGCAT GTTGTGTTCA GTAATTCAGA GAC  
 >SEQ.ID.NO. 42:  
 1 ATCTCGAGGA TGAGAGTCTT TTCCAGTTTCG C  
 >SEQ.ID.NO. 43:  
 1 GCTAGCCATG TCTGAACCAG CTCAAAAGAA ACAAAGG  
 >SEQ.ID.NO. 44:  
 1 TACTCGAGAG AAACGTATC ATTCATCAAA TAGG  
 >SEQ.ID.NO. 45:  
 1 GCTAGCCATG GCTGCCGGTG TCCCAAAAAT TGATGCG  
 >SEQ.ID.NO. 46:  
 1 TACTCGAGAA CATTGCATTT ATTGGTGTG AATC  
 >SEQ.ID.NO. 47:

La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1.

M A T F T I S K E S L P F R A D  
 K S I S Q I T L S N E R L T I V  
 V H D Y G A R A H Q L L T P D K  
 N G T F E N I L L S K N D S E T

Y A N D G G Y Y G V I C G P V A  
 G R I S G A T Y D S V S L E A N  
 E G K N N L H S G S H G W E R Q  
 F W S Y E T F E T A S S L G I K  
 L S L R D E E S G F P G Q I Q A  
 E V T Y K L T D N K L E V T I S  
 G L S V T D T V F N P A W H P Y  
 F N L S A E L S T T H E H F I Q  
 A N V D F L V E T N Q E N I P T  
 G R L L T V D D S S Y S I K E S  
 V S I K K L L K D N P E G L D D  
 C F V F N P K G D K S L M L Y D  
 P L S G R K L V A Q T D R Q A V  
 V I Y T A T N P E I E S M I N G  
 R P M S K N R G I A I E F Q E I  
 P D L V H H P E W G T I E L K A  
 G Q K K T F I T E Y L F T T N \*

>SEQ.ID.NO. 48 (NÚMERO DE REFERENCIA CAB76571 versión 1):

La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2.

M A K E Y F P Q I Q K I K F E G  
 K D S K N P L A F H Y Y D A E K  
 E V M G K K M K D W L R F A M A  
 W W H T L C A E G A D Q F G G G  
 T K S F P W N E G T D A I E I A  
 K Q K V D A G F E I M Q K L G I  
 P Y Y C F H D V D L V S E G N S  
 I E E Y E S N L K A V V A Y L K  
 E K Q K E T G I K L L W S T A N  
 V F G H K R Y M N G A S T N P D  
 F D V V A R A I V Q I K N A I D  
 A G I E L G A E N Y V F W G G R  
 E G Y M S L L N T D Q K R E K E  
 H M A T M L T M A R D Y A R S K  
 G F K G T F L I E P K P M E P T

5

K H Q Y D V D T E T A I G F L K  
 A H N L D K D F K V N I E V N H  
 A T L A G H T F E H E L A C A V  
 D A G M L G S I D A N R G D Y Q  
 N G W D T D Q F P I D Q Y E L V  
 Q A W M E I I R G G G F V T G G  
 T N F D A K T R R N S T D L E D  
 I I I A H V S G M D A M A R A L  
 E N A A K L L Q E S P Y T K M K  
 K E R Y A S F D S G I G K D F E  
 D G K L T L E Q V Y E Y G K K N  
 G E P K Q T S G K Q E L Y E A I  
 V A M Y Q \*

>SEQ.ID.NO. 49 {NÚMERO DE REFERENCIA P22842 versión 1}:

La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 3.

M E Y F K N V P Q I K Y E G P K  
 S N N P Y A F K F Y N P D E I I  
 D G K P L K E H L R F S V A Y W  
 H T F T A N G T D P F G A P T M  
 Q R P W D H F T D P M D I A K A  
 R V E A A F E L F E K L D V P F  
 F C F H D R D I A P E G E T L R  
 E T N K N L D T I V A M I K D Y  
 L K T S K T K V L W G T A N L F  
 S N P R F V H G A A T S C N A D  
 V F A Y A A A Q V K K A L E I T  
 K E L G G Q N Y V F W G G R E G  
 Y E T L L N T D M E L E L D N L  
 A R F L H M A V E Y A Q E I G F  
 E G Q F L I E P K P K E P T K H  
 Q Y D F D A A S V H A F L K K Y  
 D L D K Y F K L N I E A N H A T  
 L A G H D F Q H E L R Y A R I N  
 N M L G S I D A N M G D M L L G

5

W D T D Q Y P T D I R M T T L A  
M Y E V I K M G G F N K G G L N  
F D A K V R R A S F E P E D L F  
L G H I A G M D A F A K G F K V  
A Y K L V K D G V F D R F I E E  
R Y K S Y R E G I G A E I V S G  
K A N F K T L E E Y A L N N P K  
I E N K S G K Q E L L E S I L N  
Q Y L F S E \*

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Terranol A/S
- <120> Microorganismo
- <130> P033184WO
- 10 <150> GB 0812318.4
- <151> 04-07-2008
- <150> US 61/081.535
- 15 <151> 17-07-2008
- <160> 49
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
- <211> 1074
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Construcción sintética (L1MR)
- <220>
- 30 <221> CDS
- <222> (49)..(1053)
- <400> 1

ES 2 587 836 T3

gaattcctag aaataat	ttt gtttaacttt	aagaaggagg	agctagcc	atg gct act	57
				Met Ala Thr	
				1	
ttt aca atc agc aag gag agc ctg cca ttc aga gca gat aaa tca att	105				
Phe Thr Ile Ser Lys Glu Ser Leu Pro Phe Arg Ala Asp Lys Ser Ile					
5 10 15					
tcc caa att act ttg tca aat gaa aga tta aca atc gtc gta cac gac	153				
Ser Gln Ile Thr Leu Ser Asn Glu Arg Leu Thr Ile Val Val His Asp					
20 25 30 35					
tat gga gct aga gcc cac cag ctg ttg aca cct gac aaa aac ggt aca	201				
Tyr Gly Ala Arg Ala His Gln Leu Leu Thr Pro Asp Lys Asn Gly Thr					
40 45 50					
ttt gaa aac atc ttg ttg tcc aag aat gat tct gaa act tat gca aat	249				
Phe Glu Asn Ile Leu Leu Ser Lys Asn Asp Ser Glu Thr Tyr Ala Asn					
55 60 65					
gat ggc ggc tat tat ggt gtt att tgt ggt cct gtt gct ggc aga ata	297				
Asp Gly Gly Tyr Tyr Gly Val Ile Cys Gly Pro Val Ala Gly Arg Ile					
70 75 80					
tct gga gct act tat gac tca gtg agc tta gaa gcc aac gag ggc aaa	345				
Ser Gly Ala Thr Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Ala Asn Glu Gly Lys					
85 90 95					
aat aac tta cat tca ggc tca cac ggt tgg gaa aga caa ttt tgg agc	393				

ES 2 587 836 T3

Asn	Asn	Leu	His	Ser	Gly	Ser	His	Gly	Trp	Glu	Arg	Gln	Phe	Trp	Ser		
100					105					110					115		
tat	gag	aca	ttt	gag	act	gct	tct	tca	ttg	gga	ata	aaa	ctg	tca	ttg		441
Tyr	Glu	Thr	Phe	Glu	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Leu		
				120					125					130			
aga	gac	gaa	gaa	tct	ggt	ttt	cca	ggc	cag	att	caa	gca	gaa	gta	acc		489
Arg	Asp	Glu	Glu	Ser	Gly	Phe	Pro	Gly	Gln	Ile	Gln	Ala	Glu	Val	Thr		
				135				140						145			
tac	aaa	tta	acc	gat	aat	aaa	ctg	gaa	gta	aca	ata	agc	gga	tta	tca		537
Tyr	Lys	Leu	Thr	Asp	Asn	Lys	Leu	Glu	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Ser		
		150					155						160				
gtt	act	gat	act	gtt	ttt	aat	cct	gcc	tgg	cac	cct	tat	ttc	aat	ctt		585
Val	Thr	Asp	Thr	Val	Phe	Asn	Pro	Ala	Trp	His	Pro	Tyr	Phe	Asn	Leu		
	165					170					175						
agc	gca	gaa	ctt	agc	acc	act	cac	gaa	cac	ttc	ata	caa	gcc	aac	gtg		633
Ser	Ala	Glu	Leu	Ser	Thr	Thr	His	Glu	His	Phe	Ile	Gln	Ala	Asn	Val		
180					185					190					195		
gac	ttt	tta	gta	gaa	acc	aat	cag	gag	aac	atc	cct	acc	gga	aga	ctg		681
Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Asn	Gln	Glu	Asn	Ile	Pro	Thr	Gly	Arg	Leu		
				200					205					210			
ctt	act	gtt	gat	gat	tca	agc	tat	tct	att	aaa	gaa	agc	gtc	tcc	att		729
Leu	Thr	Val	Asp	Asp	Ser	Ser	Tyr	Ser	Ile	Lys	Glu	Ser	Val	Ser	Ile		
			215					220					225				
aag	aag	ttg	ttg	aag	gat	aac	cca	gaa	ggt	ttg	gac	gat	tgc	ttt	gtt		777
Lys	Lys	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Pro	Glu	Gly	Leu	Asp	Asp	Cys	Phe	Val		
		230					235					240					
ttc	aat	cca	aaa	gga	gac	aaa	tcc	ctt	atg	tta	tac	gat	cca	ctg	agc		825
Phe	Asn	Pro	Lys	Gly	Asp	Lys	Ser	Leu	Met	Leu	Tyr	Asp	Pro	Leu	Ser		
	245					250					255						
ggt	aga	aaa	ttg	gtt	gca	caa	act	gat	cgt	caa	gcc	gtc	gtt	att	tac		873
Gly	Arg	Lys	Leu	Val	Ala	Gln	Thr	Asp	Arg	Gln	Ala	Val	Val	Ile	Tyr		
260					265				270					275			
acc	gca	acg	aac	cca	gag	att	gaa	tca	atg	ata	aat	ggt	aga	cct	atg		921
Thr	Ala	Thr	Asn	Pro	Glu	Ile	Glu	Ser	Met	Ile	Asn	Gly	Arg	Pro	Met		
				280					285					290			
tcc	aaa	aat	aga	ggc	ata	gcc	att	gag	ttt	caa	gaa	atc	ccg	gat	ctt		969
Ser	Lys	Asn	Arg	Gly	Ile	Ala	Ile	Glu	Phe	Gln	Glu	Ile	Pro	Asp	Leu		
			295					300					305				
gtt	cac	cac	cca	gaa	tgg	gga	acc	att	gaa	ttg	aaa	gct	ggc	caa	aag		1017
Val	His	His	Pro	Glu	Trp	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Lys	Ala	Gly	Gln	Lys		
			310				315					320					
aaa	act	ttt	atc	act	gag	tat	ttg	ttc	acc	act	aac	tagcctaggc					1063
Lys	Thr	Phe	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Phe	Thr	Thr	Asn						
	325					330					335						
tcgaggaatt	c																1074



ES 2 587 836 T3

Val	Ala	Arg	Ala	Ile	Val	Gln	Ile	Lys	Asn	Ala	Ile	Asp	Ala	Gly	Ile		
	165					170					175						
gag	ttg	ggc	gcc	gag	aat	tac	ggt	ttc	tgg	ggt	ggc	cgt	gag	ggt	tat	633	
Glu	Leu	Gly	Ala	Glu	Asn	Tyr	Val	Phe	Trp	Gly	Gly	Arg	Glu	Gly	Tyr		
180					185					190					195		
atg	agc	ctt	tta	aat	acg	gat	caa	aaa	cgt	gag	aag	gaa	cac	atg	gct	681	
Met	Ser	Leu	Leu	Asn	Thr	Asp	Gln	Lys	Arg	Glu	Lys	Glu	His	Met	Ala		
				200					205					210			
aca	atg	ctt	acg	atg	gcc	cgt	gac	tat	gct	aga	tca	aaa	ggt	ttt	aag	729	
Thr	Met	Leu	Thr	Met	Ala	Arg	Asp	Tyr	Ala	Arg	Ser	Lys	Gly	Phe	Lys		
			215					220					225				
ggt	aca	ttc	ttg	ata	gaa	cct	aaa	cgc	atg	gaa	cca	aca	aag	cac	caa	777	
Gly	Thr	Phe	Leu	Ile	Glu	Pro	Lys	Pro	Met	Glu	Pro	Thr	Lys	His	Gln		
		230					235					240					
tat	gat	gta	gat	acc	gaa	acc	gca	att	gga	ttt	ttg	aag	gca	cat	aac	825	
Tyr	Asp	Val	Asp	Thr	Glu	Thr	Ala	Ile	Gly	Phe	Leu	Lys	Ala	His	Asn		
	245					250					255						
ttg	gac	aag	gat	ttc	aag	gta	aac	ata	gaa	gta	aat	cat	gca	acg	ttg	873	
Leu	Asp	Lys	Asp	Phe	Lys	Val	Asn	Ile	Glu	Val	Asn	His	Ala	Thr	Leu		
260					265					270					275		
gca	ggt	cat	act	ttc	gaa	cac	gaa	tta	gct	tgc	gca	gta	gat	gct	gga	921	
Ala	Gly	His	Thr	Phe	Glu	His	Glu	Leu	Ala	Cys	Ala	Val	Asp	Ala	Gly		
				280					285					290			
atg	tta	ggt	agc	atc	gat	gca	aat	aga	ggt	gat	tac	cag	aat	ggc	tgg	969	
Met	Leu	Gly	Ser	Ile	Asp	Ala	Asn	Arg	Gly	Asp	Tyr	Gln	Asn	Gly	Trp		
			295					300					305				
gat	act	gat	caa	ttc	cca	ata	gac	cag	tat	gaa	ctg	gta	cag	gcc	tgg	1017	
Asp	Thr	Asp	Gln	Phe	Pro	Ile	Asp	Gln	Tyr	Glu	Leu	Val	Gln	Ala	Trp		
		310					315					320					
atg	gaa	ata	atc	cgt	ggc	ggt	ggt	ttc	gtg	aca	ggt	gga	aca	aat	ttt	1065	
Met	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Gly	Gly	Phe	Val	Thr	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe		
	325					330					335						
gat	gca	aaa	act	cgt	aga	aac	tca	act	gat	ctt	gag	gat	atc	att	atc	1113	
Asp	Ala	Lys	Thr	Arg	Arg	Asn	Ser	Thr	Asp	Leu	Glu	Asp	Ile	Ile	Ile		
340					345					350					355		
gct	cac	gta	tct	ggc	atg	gac	gct	atg	gcc	cgt	gca	ttg	gag	aac	gct	1161	
Ala	His	Val	Ser	Gly	Met	Asp	Ala	Met	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala		
				360					365					370			
gct	aag	ctt	tta	caa	gag	tcc	cca	tat	acg	aag	atg	aag	aaa	gag	aga	1209	
Ala	Lys	Leu	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Tyr	Thr	Lys	Met	Lys	Lys	Glu	Arg		
			375					380					385				
tat	gct	tct	ttt	gat	agc	ggt	ata	gga	aaa	gac	ttc	gag	gat	gga	aag	1257	
Tyr	Ala	Ser	Phe	Asp	Ser	Gly	Ile	Gly	Lys	Asp	Phe	Glu	Asp	Gly	Lys		
		390					395					400					
ctg	aca	ctg	gag	caa	gtg	tac	gaa	tat	ggt	aaa	aag	aat	ggt	gaa	cca	1305	
Leu	Thr	Leu	Glu	Gln	Val	Tyr	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys	Asn	Gly	Glu	Pro		

ES 2 587 836 T3

	405	410	415	
	aaa cag acc tca gga aag cag gaa tta tat gaa gcc att gtg gct atg			1353
	Lys Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Leu Tyr Glu Ala Ile Val Ala Met			
	420	425	430	435
	tac caa tagcctaggc tcgaggaatt c			1380
	Tyr Gln			
	<210> 3			
	<211> 1383			
5	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
10	<223> Construcción sintética (ThXI)			
	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (49)..(1362)			
15	<400> 3			
	gaattcctag aaataatttt gtttaacttt aagaaggagg agctagcc atg gaa tat			57
			Met Glu Tyr	
			1	
	ttc aaa aac gtg cca cag atc aag tat gaa ggt cct aaa agc aat aac			105
	Phe Lys Asn Val Pro Gln Ile Lys Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Asn Asn			
	5	10	15	
	cct tat gca ttt aag ttc tat aac cca gat gaa att ata gat gga aaa			153
	Pro Tyr Ala Phe Lys Phe Tyr Asn Pro Asp Glu Ile Ile Asp Gly Lys			
	20	25	30	35
	cca tta aaa gaa cac tta aga ttt agc gta gcc tac tgg cat aca ttt			201
	Pro Leu Lys Glu His Leu Arg Phe Ser Val Ala Tyr Trp His Thr Phe			
		40	45	50
	acc gct aac gga acg gat cca ttt ggt gca ccg act atg cag cgt cct			249
	Thr Ala Asn Gly Thr Asp Pro Phe Gly Ala Pro Thr Met Gln Arg Pro			
		55	60	65
	tgg gat cat ttt acc gac cct atg gac ata gca aaa gca cgt gtg gaa			297
	Trp Asp His Phe Thr Asp Pro Met Asp Ile Ala Lys Ala Arg Val Glu			
		70	75	80
	gcc gca ttc gag ctt ttt gaa aaa ttg gat gtt cca ttc ttc tgt ttt			345
	Ala Ala Phe Glu Leu Phe Glu Lys Leu Asp Val Pro Phe Phe Cys Phe			
		85	90	95
	cat gac aga gat ata gct ccg gaa ggt gaa aca ttg aga gaa acc aac			393
	His Asp Arg Asp Ile Ala Pro Glu Gly Glu Thr Leu Arg Glu Thr Asn			
	100	105	110	115
	aaa aac tta gat act atc gtt gct atg att aaa gac tac tta aaa acg			441
	Lys Asn Leu Asp Thr Ile Val Ala Met Ile Lys Asp Tyr Leu Lys Thr			
		120	125	130

ES 2 587 836 T3

tca aag act aaa gtt ctt tgg ggc act gct aat ttg ttt tct aat cca	489
Ser Lys Thr Lys Val Leu Trp Gly Thr Ala Asn Leu Phe Ser Asn Pro	
135 140 145	
cgf ttc gtg cat ggc gct gcc aca tca tgt aat gca gac gta ttt gct	537
Arg Phe Val His Gly Ala Ala Thr Ser Cys Asn Ala Asp Val Phe Ala	
150 155 160	
tat gca gcc gct caa gtt aaa aag gcc tta gag att acc aaa gag tta	585
Tyr Ala Ala Ala Gln Val Lys Lys Ala Leu Glu Ile Thr Lys Glu Leu	
165 170 175	
gga ggc cag aat tat gtt ttc tgg ggt ggt cgt gag gga tat gag aca	633
Gly Gly Gln Asn Tyr Val Phe Trp Gly Gly Arg Glu Gly Tyr Glu Thr	
180 185 190 195	
ctt tta aat act gat atg gag ttg gaa tta gat aat tta gca aga ttc	681
Leu Leu Asn Thr Asp Met Glu Leu Glu Leu Asp Asn Leu Ala Arg Phe	
200 205 210	
tta cac atg gca gta gaa tat gct cag gaa att ggt ttt gaa gga cag	729
Leu His Met Ala Val Glu Tyr Ala Gln Glu Ile Gly Phe Glu Gly Gln	
215 220 225	
ttc ttg atc gag cct aaa cca aag gaa cca aca aag cat cag tat gat	777
Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Lys Glu Pro Thr Lys His Gln Tyr Asp	
230 235 240	
ttc gac gct gct tct gta cac gcc ttt ttg aag aag tat gat ttg gat	825
Phe Asp Ala Ala Ser Val His Ala Phe Leu Lys Lys Tyr Asp Leu Asp	
245 250 255	
aaa tac ttt aag ttg aac ata gag gct aat cac gca acg ttg gca ggt	873
Lys Tyr Phe Lys Leu Asn Ile Glu Ala Asn His Ala Thr Leu Ala Gly	
260 265 270 275	
cac gat ttt caa cac gaa ttg aga tac gcc cgt att aat aac atg tta	921
His Asp Phe Gln His Glu Leu Arg Tyr Ala Arg Ile Asn Asn Met Leu	
280 285 290	
ggt tcc ata gat gcc aac atg ggt gac atg ttg ctg ggt tgg gat act	969
Gly Ser Ile Asp Ala Asn Met Gly Asp Met Leu Leu Gly Trp Asp Thr	
295 300 305	
gat caa tac cca acg gat att aga atg aca act tta gca atg tac gag	1017
Asp Gln Tyr Pro Thr Asp Ile Arg Met Thr Thr Leu Ala Met Tyr Glu	
310 315 320	
gtc att aaa atg gga ggt ttt aac aaa gga ggt ttg aat ttc gat gct	1065
Val Ile Lys Met Gly Gly Phe Asn Lys Gly Gly Leu Asn Phe Asp Ala	
325 330 335	
aaa gtg cgt cgt gcc tct ttt gaa cct gaa gac ctt ttt ctt gga cat	1113
Lys Val Arg Arg Ala Ser Phe Glu Pro Glu Asp Leu Phe Leu Gly His	
340 345 350 355	
att gcc gga atg gat gca ttt gca aaa ggt ttc aag gtc gct tat aag	1161
Ile Ala Gly Met Asp Ala Phe Ala Lys Gly Phe Lys Val Ala Tyr Lys	
360 365 370	
ctt gtt aag gat ggt gta ttt gat aga ttc att gaa gag aga tac aaa	1209

ES 2 587 836 T3

	Leu Val Lys Asp Gly Val Phe Asp Arg Phe Ile Glu Glu Arg Tyr Lys	
	375 380 385	
	tcc tat cgt gaa ggt ata ggt gct gaa atc gtt tca ggt aag gcc aat	1257
	Ser Tyr Arg Glu Gly Ile Gly Ala Glu Ile Val Ser Gly Lys Ala Asn	
	390 395 400	
	ttt aag act tta gag gaa tat gca ttg aat aac cca aaa atc gaa aac	1305
	Phe Lys Thr Leu Glu Glu Tyr Ala Leu Asn Asn Pro Lys Ile Glu Asn	
	405 410 415	
	aaa agc ggt aaa cag gaa ctg ctg gaa tct att ttg aat caa tat ttg	1353
	Lys Ser Gly Lys Gln Glu Leu Leu Glu Ser Ile Leu Asn Gln Tyr Leu	
	420 425 430 435	
	ttc tct gaa tagcctaggc tcgaggaatt c	1383
	Phe Ser Glu	
	<210> 4	
	<211> 40	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
10	<400> 4	
	gctagccatg gccactacco catttgatgc tccagataag	40
	<210> 5	
	<211> 43	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 5	
	ctcgagccta ggctagtgtt tcaattcact ttccatcttg gcc	43
	<210> 6	
25	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 6	
	gctagccatg gcttctatta agttgaactc tggttacg	38
35	<210> 7	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 7	
45	ctcgagccta ggctagacga agataggaat cttgtcccag tccc	44
	<210> 8	
	<211> 34	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 8	
	gctagccatg gctgctaacc cttccttggt gttg	34
	<210> 9	
10	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 9	
	ctcgagccta ggctactcag ggccgtcaat gagacaacttg acagcacc	49
20	<210> 10	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 10	
30	tagctagcat gttatcagta cctgattatg ag	32
	<210> 11	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 11	
40	atctcgagtt actttaagaa tgccttagtc atgcc	35
	<210> 12	
	<211> 34	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 12	
50	tagctagcat gaatttagtt gaaacagccc aagc	34
	<210> 13	
	<211> 33	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 13	
60	atctcgagct aatatttgat tgcttgccca gcc	33
	<210> 14	
	<211> 33	
65	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 14	
	tagctagcat gctagaagca ttaaaacaag aag	33
	<210> 15	
10	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 15	
	atctcgagtt acttgogaac tgcgatgatcc ttag	34
	<210> 16	
20	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador	
	<400> 16	
	tagctagcat gacagctcag ttacaaagtg aaag	34
30	<210> 17	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 17	
40	atctcgagtc aggaaaatct gtagacaatc ttgg	34
	<210> 18	
	<211> 37	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 18	
50	tagctagcat ggccagattt tccgctgaag atatgag	37
	<210> 19	
	<211> 37	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 19	
	tagtttaaac ttgccatcat cattccctag aaactgc	37
	<210> 20	
65	<211> 33	

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador  
  
 <400> 20  
 tagtcgacag tgtgtaagag tgtaccattt act 33  
  
 10 <210> 21  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 21  
 20 tactcgagtt tccctttttc tgcctttttc ggtg 34  
  
 <210> 22  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 22  
 30 tagtttaaac tgatggtgtg gaagacatag atgg 34  
  
 <210> 23  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 23  
 40 tagtttaaac agttatgttt aaaaaatcaa ctttctttcc 40  
  
 <210> 24  
 <211> 33  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 24  
 50 tagtcgacaa ccaggtcctt gtgtgccgct gtt 33  
  
 <210> 25  
 <211> 32  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 60  
 <400> 25  
 tactcgagtc ctatcgagtt aactgctag tg 32  
  
 <210> 26  
 65 <211> 36

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador  
  
 <400> 26  
 tagtttaaac attgcttagc atagctgccca ctaacc 36  
  
 10 <210> 27  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 27  
 tagtcgactg acatgtatgg gttgaaaata ttttag 35  
 20  
 <210> 28  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 28  
 30 tacctaggtt ttaggctggt atcttgattc 30  
  
 <210> 29  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 40 <400> 29  
 tagtcgactg tttaaagatt acggatattt aac 33  
  
 <210> 30  
 <211> 36  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 50 <400> 30  
 tacctaggtt ttagtttatg tatgtgtttt ttgtag 36  
  
 <210> 31  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Cebador  
  
 <400> 31  
 tagtcgacaa aaggtctaac atcctttgag ttatg 35  
  
 65 <210> 32

<211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Cebador

<400> 32  
 tacctagggt tatgttaact tttgttactt 30

10 <210> 33  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador

<400> 33  
 20 tagtcgacag ggtagcctcc ccataacata aac 33

<210> 34  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

30 <400> 34  
 tacctagggt tgattgattt gactgtgtta ttttgcg 37

<210> 35  
 <211> 31  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

40 <400> 35  
 tagtcgacat aacaatactg acagtactaa a 31

<210> 36  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 50 <223> Cebador

<400> 36  
 tacctagggt tgaatatgta ttacttggtt atgg 34

55 <210> 37  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Cebador

<400> 37  
 65 tagtcgacca catgcagtga tgcacgcgcg 30

	<210> 38	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 38	
10	tacctaggta ttgtaatatg tgtgtttggg tgg	33
	<210> 39	
	<211> 36	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 39	
	tatctagaat gactcaattc actgacattg ataagc	36
	<210> 40	
	<211> 39	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 40	
	tactcgagtt agaaagcttt tttcaaagga gaaattagc	39
	<210> 41	
35	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador	
	<400> 41	
	tagctagcat gttgtgttca gtaattcaga gac	33
45	<210> 42	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 42	
55	atctcgagga tgagagtctt ttccagttcg c	31
	<210> 43	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 43	
65	gctagccatg tctgaaccag ctcaaaagaa acaaaagg	38

ES 2 587 836 T3

<210> 44  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 44  
 10 tactcgagag aaactgtatc attcatcaaa tagg 34  
 <210> 45  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20 <400> 45 37  
 gctagccatg gctgcccgtg tcccataaat tgatgcg  
 <210> 46  
 <211> 34  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 46 34  
 tactcgagaa cattgcattt attggtggtg aatc  
 <210> 47  
 <211> 335  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética (L1MR)  
 40 <400> 47  
 Met Ala Thr Phe Thr Ile Ser Lys Glu Ser Leu Pro Phe Arg Ala Asp  
 1 5 10 15

ES 2 587 836 T3

Lys Ser Ile Ser Gln Ile Thr Leu Ser Asn Glu Arg Leu Thr Ile Val  
 20 25 30

Val His Asp Tyr Gly Ala Arg Ala His Gln Leu Leu Thr Pro Asp Lys  
 35 40 45

Asn Gly Thr Phe Glu Asn Ile Leu Leu Ser Lys Asn Asp Ser Glu Thr  
 50 55 60

Tyr Ala Asn Asp Gly Gly Tyr Tyr Gly Val Ile Cys Gly Pro Val Ala  
 65 70 75 80

Gly Arg Ile Ser Gly Ala Thr Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Ala Asn  
 85 90 95

Glu Gly Lys Asn Asn Leu His Ser Gly Ser His Gly Trp Glu Arg Gln  
 100 105 110

Phe Trp Ser Tyr Glu Thr Phe Glu Thr Ala Ser Ser Leu Gly Ile Lys  
 115 120 125

Leu Ser Leu Arg Asp Glu Glu Ser Gly Phe Pro Gly Gln Ile Gln Ala  
 130 135 140

Glu Val Thr Tyr Lys Leu Thr Asp Asn Lys Leu Glu Val Thr Ile Ser  
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Val Thr Asp Thr Val Phe Asn Pro Ala Trp His Pro Tyr  
 165 170 175

Phe Asn Leu Ser Ala Glu Leu Ser Thr Thr His Glu His Phe Ile Gln  
 180 185 190

Ala Asn Val Asp Phe Leu Val Glu Thr Asn Gln Glu Asn Ile Pro Thr  
 195 200 205

Gly Arg Leu Leu Thr Val Asp Asp Ser Ser Tyr Ser Ile Lys Glu Ser  
 210 215 220

Val Ser Ile Lys Lys Leu Leu Lys Asp Asn Pro Glu Gly Leu Asp Asp  
 225 230 235 240

Cys Phe Val Phe Asn Pro Lys Gly Asp Lys Ser Leu Met Leu Tyr Asp  
 245 250 255

ES 2 587 836 T3

Pro Leu Ser Gly Arg Lys Leu Val Ala Gln Thr Asp Arg Gln Ala Val  
 260 265 270

Val Ile Tyr Thr Ala Thr Asn Pro Glu Ile Glu Ser Met Ile Asn Gly  
 275 280 285

Arg Pro Met Ser Lys Asn Arg Gly Ile Ala Ile Glu Phe Gln Glu Ile  
 290 295 300

Pro Asp Leu Val His His Pro Glu Trp Gly Thr Ile Glu Leu Lys Ala  
 305 310 315 320

Gly Gln Lys Lys Thr Phe Ile Thr Glu Tyr Leu Phe Thr Thr Asn  
 325 330 335

<210> 48

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética (PmXI)

<400> 48

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

15

ES 2 587 836 T3

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

ES 2 587 836 T3

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> 49

<211> 438

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética (ThXI)

<400> 49

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

Ser Asn Asn Pro Tyr Ala Phe Lys Phe Tyr Asn Pro Asp Glu Ile Ile  
 20 25 30

Asp Gly Lys Pro Leu Lys Glu His Leu Arg Phe Ser Val Ala Tyr Trp  
 35 40 45

His Thr Phe Thr Ala Asn Gly Thr Asp Pro Phe Gly Ala Pro Thr Met  
 50 55 60

Gln Arg Pro Trp Asp His Phe Thr Asp Pro Met Asp Ile Ala Lys Ala  
 65 70 75 80

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

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

Glu Thr Asn Lys Asn Leu Asp Thr Ile Val Ala Met Ile Lys Asp Tyr  
 115 120 125

15

ES 2 587 836 T3

Leu Lys Thr Ser Lys Thr Lys Val Leu Trp Gly Thr Ala Asn Leu Phe  
 130 135 140  
 Ser Asn Pro Arg Phe Val His Gly Ala Ala Thr Ser Cys Asn Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Val Phe Ala Tyr Ala Ala Ala Gln Val Lys Lys Ala Leu Glu Ile Thr  
 165 170 175  
 Lys Glu Leu Gly Gly Gln Asn Tyr Val Phe Trp Gly Gly Arg Glu Gly  
 180 185 190  
 Tyr Glu Thr Leu Leu Asn Thr Asp Met Glu Leu Glu Leu Asp Asn Leu  
 195 200 205  
 Ala Arg Phe Leu His Met Ala Val Glu Tyr Ala Gln Glu Ile Gly Phe  
 210 215 220  
 Glu Gly Gln Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Lys Glu Pro Thr Lys His  
 225 230 235 240  
 Gln Tyr Asp Phe Asp Ala Ala Ser Val His Ala Phe Leu Lys Lys Tyr  
 245 250 255  
 Asp Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Leu Asn Ile Glu Ala Asn His Ala Thr  
 260 265 270  
 Leu Ala Gly His Asp Phe Gln His Glu Leu Arg Tyr Ala Arg Ile Asn  
 275 280 285  
 Asn Met Leu Gly Ser Ile Asp Ala Asn Met Gly Asp Met Leu Leu Gly  
 290 295 300  
 Trp Asp Thr Asp Gln Tyr Pro Thr Asp Ile Arg Met Thr Thr Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Met Tyr Glu Val Ile Lys Met Gly Gly Phe Asn Lys Gly Gly Leu Asn  
 325 330 335  
 Phe Asp Ala Lys Val Arg Arg Ala Ser Phe Glu Pro Glu Asp Leu Phe  
 340 345 350  
 Leu Gly His Ile Ala Gly Met Asp Ala Phe Ala Lys Gly Phe Lys Val  
 355 360 365

ES 2 587 836 T3

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

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

Lys Ala Asn Phe Lys Thr Leu Glu Glu Tyr Ala Leu Asn Asn Pro Lys  
405 410 415

Ile Glu Asn Lys Ser Gly Lys Gln Glu Leu Leu Glu Ser Ile Leu Asn  
420 425 430

Gln Tyr Leu Phe Ser Glu  
435

## REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo transformado, capaz de: (i) convertir una aldopentosa a una cetopentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación; y/o (ii) una mayor velocidad de crecimiento en presencia de la aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación; en donde dicho microorganismo comprende un promotor heterólogo unido operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica una aldosa-1-epimerasa endógena y/o en donde dicho microorganismo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una aldosa-1-epimerasa exógena, posibilitando de este modo que el microorganismo sobreexpresé dicha aldosa-1-epimerasa; y,
- dicho microorganismo comprende una o más secuencias polinucleotídicas exógenas que codifican uno o más polipéptidos implicados en la conversión de una aldopentosa a una cetopentosa, en donde dichos uno o más polipéptidos se seleccionan entre el grupo que consiste en (i) a (vii) a continuación:
- (i) xilosa isomerasa;
  - (ii) arabinosa isomerasa;
  - (iii) D-lixosa isomerasa;
  - (iv) ribosa isomerasa;
  - (v) la combinación de xilosa reductasa y xilulosa reductasa;
  - (vi) la combinación de arabinosa reductasa, L-arabitol 4-deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa y D-xilulosa reductasa;
  - (vii) la combinación de D-lixosa reductasa y D-arabinitol deshidrogenasa;
- y/o
- dicho microorganismo comprende al menos un vector de expresión que codifica una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en ribulocinasa, ribulosa fosfato 4-epimerasa, xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa y cualquier otra enzima de la vía de pentosa fosfato; y/o
- dicho microorganismo comprende un promotor heterólogo unido operablemente a una o más secuencias de nucleótidos que codifican una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa y cualquier otra enzima de la vía de pentosa fosfato que haga que el microorganismo sobreexpresé las una o más enzimas cuando se compara el microorganismo con el microorganismo equivalente sin el promotor; y en donde dicho microorganismo es una levadura transformada.
2. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha aldopentosa se selecciona del grupo que consiste de xilosa, arabinosa, ribosa y lixosa.
3. El microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha cetopentosa es xilulosa.
4. Un inóculo que comprende un microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un medio de cultivo que comprende un microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Un método para preparar un microorganismo transformado, capaz de: (i) producir un compuesto derivado de pentosa; y/o (ii) convertir una aldopentosa a una cetopentosa a una mayor velocidad que el microorganismo equivalente antes de la transformación; y/o (iii) una mayor velocidad de crecimiento en presencia de aldopentosa que el microorganismo equivalente antes de la transformación;
- dicho método comprendiendo el paso de transformar un microorganismo con una secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa y/o un promotor heterólogo que posibilita que el microorganismo sobreexpresé una aldosa-1-epimerasa endógena cuando se compara el microorganismo con el microorganismo equivalente sin el promotor,
- en donde dicho microorganismo transformado es capaz de convertir una aldopentosa a un compuesto derivado de pentosa; y,
- dicho microorganismo comprende una o más secuencias de polinucleótidos exógenas que codifican uno o más polipéptidos implicados en la conversión de una aldopentosa a una cetopentosa, en donde dichos uno o más polipéptidos se seleccionan entre el grupo que consiste en (i) a (vii) a continuación:
- (i) xilosa isomerasa;
  - (ii) arabinosa isomerasa;
  - (iii) D-lixosa isomerasa;
  - (iv) ribosa isomerasa;
  - (v) la combinación de xilosa reductasa y xilulosa reductasa;
  - (vi) la combinación de arabinosa reductasa, L-arabitol 4-deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa y D-xilulosa reductasa;
  - (vii) la combinación de D-lixosa reductasa y D-arabinitol deshidrogenasa;

y/o

dicho microorganismo comprende al menos un vector de expresión que codifica una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en ribulocinasa, ribulosa fosfato 4-epimerasa, xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa y cualquier otra enzima de la vía de pentosa fosfato; y/o

dicho microorganismo se ha transformado con un promotor heterólogo unido operablemente a una o más secuencias de nucleótidos que codifican una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en xilulocinasa, D-ribulocinasa, ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transaldolasa, transcetolasa y cualquier otra enzima de la vía de pentosa fosfato que haga que el microorganismo sobreexpresé las una o más enzimas cuando se compara el microorganismo con el microorganismo equivalente sin el promotor;

y en donde dicho microorganismo es una levadura transformada.

7. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica para una aldosa-1-epimerasa es un vector de expresión que codifica para la misma.

8. Un método para producir un compuesto derivado de pentosa, en donde dicho método comprende cultivar en un medio de cultivo un microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

9. Un método para producir un biocombustible, en donde dicho método comprende el paso de cultivar en un medio de cultivo un microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

10. El método de conformidad con la reivindicación 9, en donde dicho método comprende además el paso de obtener el biocombustible a partir del medio de cultivo.

11. El uso de un microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la producción de un producto derivado de pentosa.

12. El uso de un microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la producción de un biocombustible.

# Vías de D-xilulosa y L-arabinosa en PPP

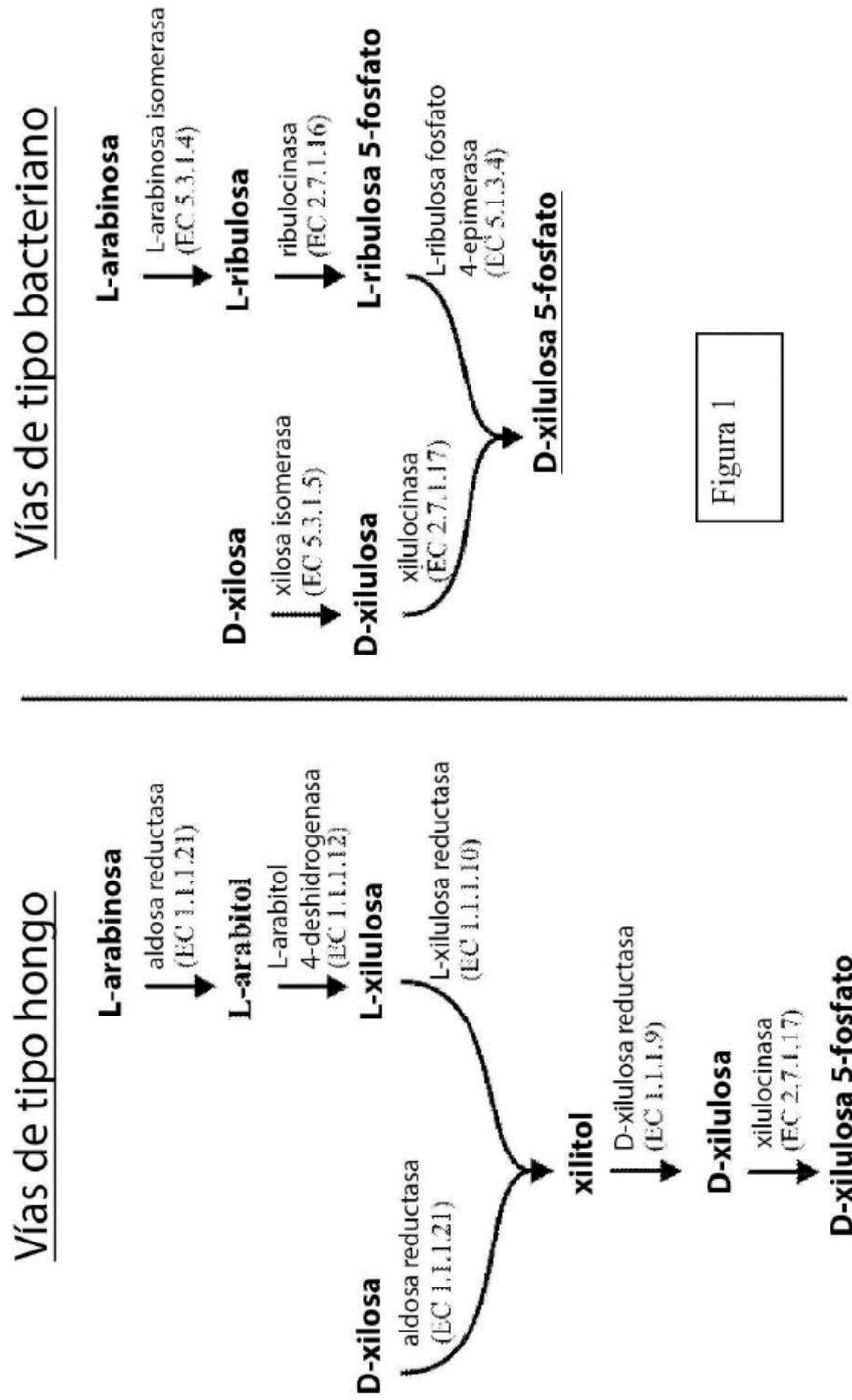


Figura 1

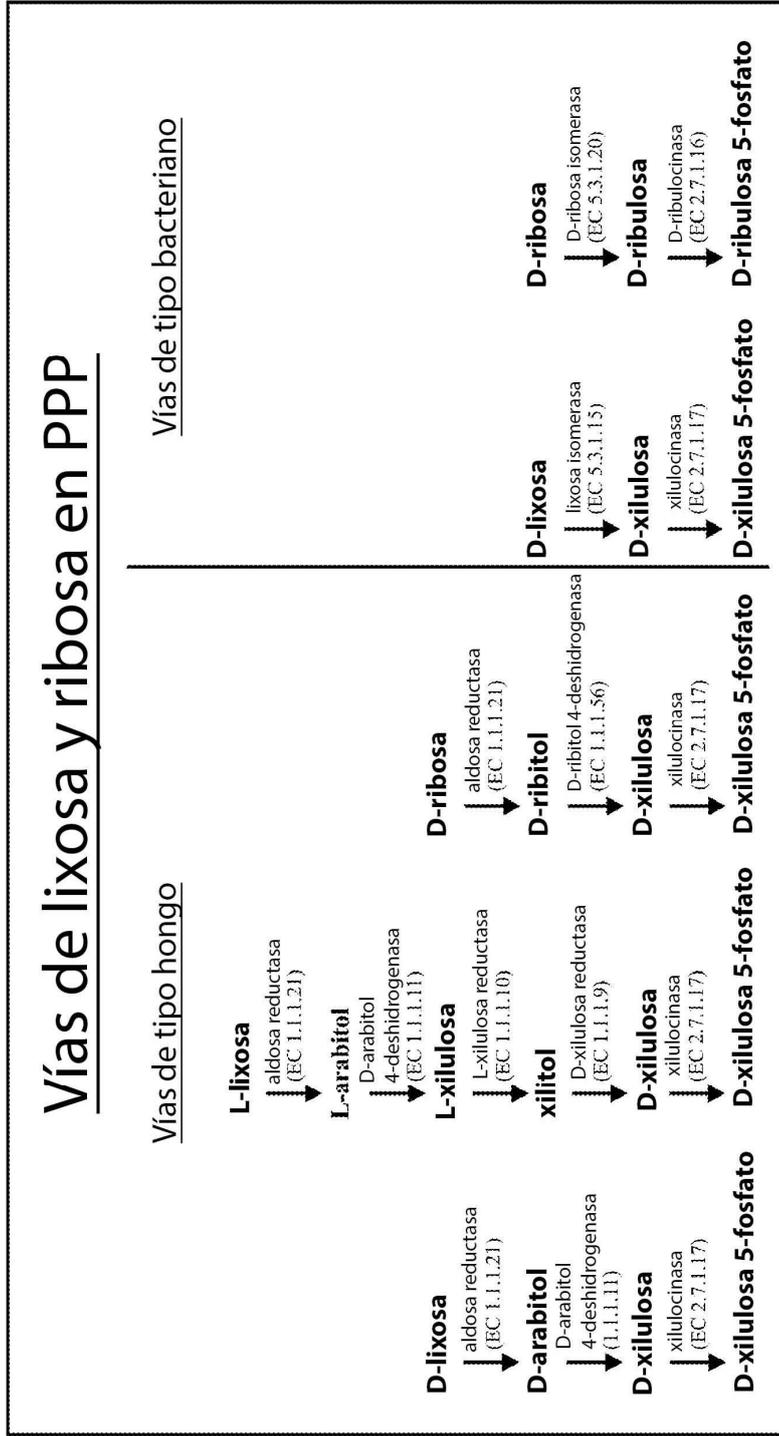


Figura 2

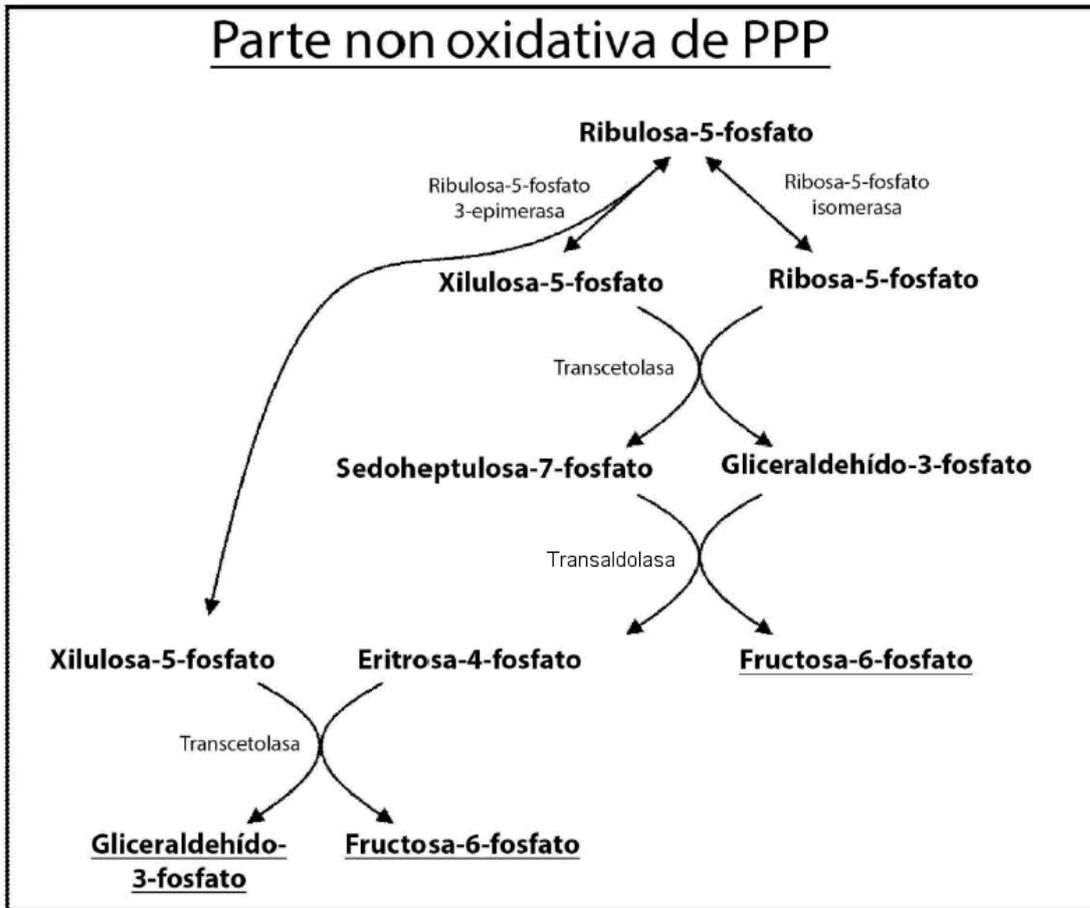


Figura 3

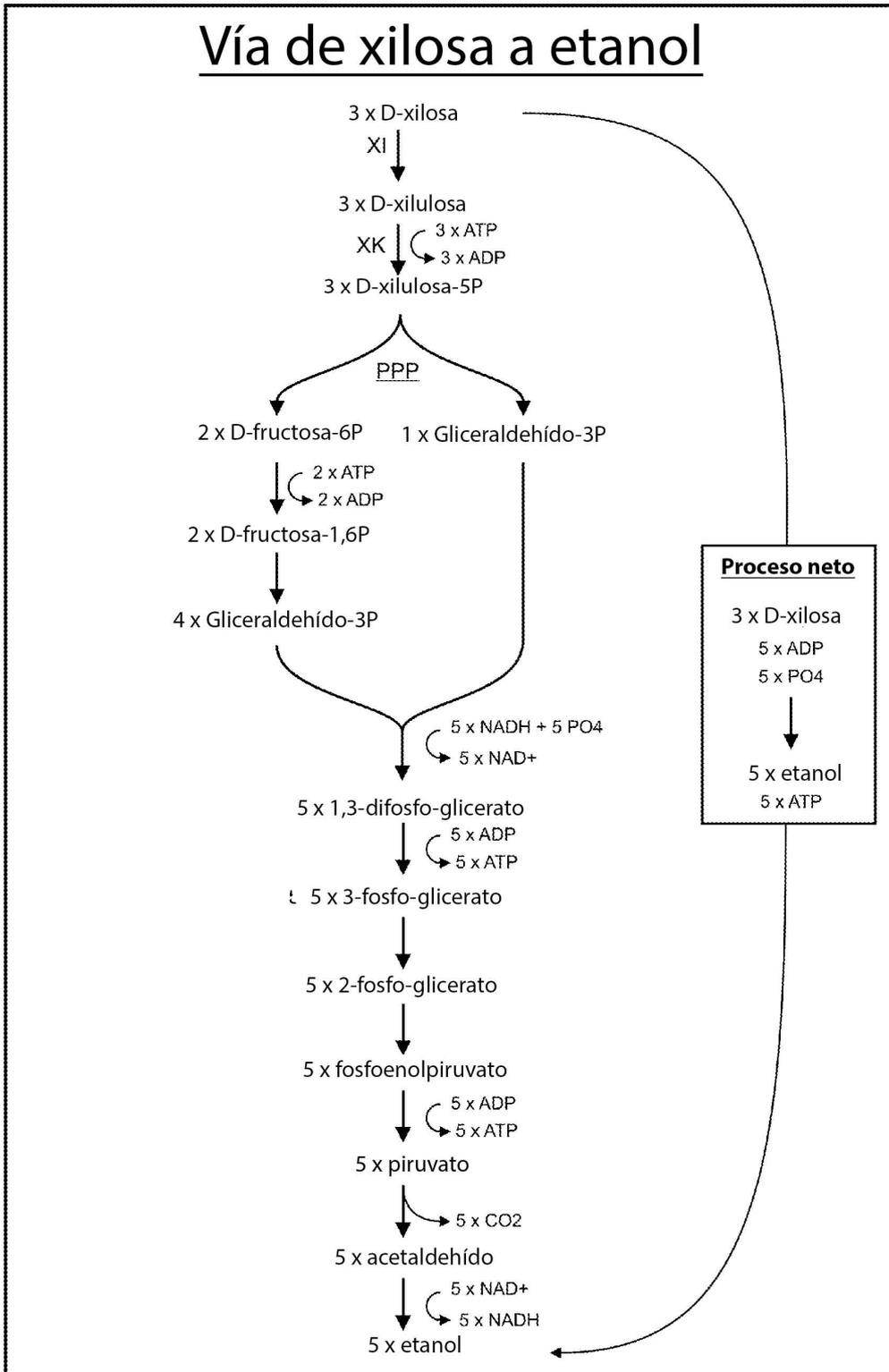


Figura 4