(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 645 963**

(51) Int. CI.:

C12N 9/92 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2012 PCT/EP2012/065088**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13017644**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012 E 12741015 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2739729**

(54) Título: **Una célula fermentadora de azúcar pentosa**

(30) Prioridad:

04.08.2011 EP 11176601
04.08.2011 US 201161515014 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2017

(73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon, 1
6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es:

KLAASSEN, PAUL;
DE JONG, RENÉ MARCEL y
VAN SUYLEKOM, GIJSBERDINA PIETERNELLA

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Una célula fermentadora de azúcar pentosa

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con una célula que es capaz de isomerizar la xilosa a xilulosa. La invención también se relaciona con un proceso en el cual tales células son utilizadas para la producción de un producto de fermentación, tal como etanol.

Antecedentes de la invención

El consumo a gran escala de combustibles fósiles tradicionales (combustibles basados en petróleo) en las décadas recientes ha contribuido a altos niveles de contaminación. Esto, junto con la conclusión de que las reservas mundiales de combustibles fósiles no son limitadas y una preocupación ambiental creciente, ha estimulado nuevas iniciativas para investigar la factibilidad de combustibles alternativos tales como etanol, el cual es una fuente combustible de combustión libre de partículas que liberan menos CO_2 que la gasolina sin plomo por litro.

Aunque el etanol derivado de una biomasa puede producirse por la fermentación de azúcares de hexosa obtenidos a partir de muchas fuentes diferentes, los sustratos típicamente utilizados en producción a escala comercial de alcohol combustible, tales como caña de azúcar y almidón de maíz, son costosos. Los incrementos en la producción de etanol combustible requerirán por lo tanto el uso de materias primas menos costosas.

Actualmente, solamente las materias primas lignocelulósicas derivadas de biomasa vegetales están disponibles en cantidades suficientes para sustituir los cultivos utilizados actualmente para la producción de etanol. La mayor parte del material lignocelulósico, el segundo azúcar más común, después de la glucosa, es la xilosa. Así, para un proceso de producción de combustible económicamente factible, los azúcares tanto de hexosa como de pentosa deberían ser fermentados para formar etanol. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es robusta y bien adaptada para la producción de etanol, pero es incapaz de producir etanol utilizando xilosa como fuente de carbono. También, no se conocen organismos de origen natural que puedan fermentar la xilosa a etanol con tanto un alto rendimiento de etanol como con una alta productividad de etanol. La patente internacional WO201/074577 describe el crecimiento anaeróbico en la producción de xilosa y etanol mediante *Saccharomyces* transformada con la xilosa isomerasa de *Clostridium difficile*. El número de acceso A6LW13 de Uniprot muestra la secuencia de aminoácidos de la xilosa isomerasa de *Clostridium beijerinckii*. Por lo tanto hay necesidad de un organismo que posea estas propiedades de forma que permita la producción comercialmente viable de etanol a partir de materias primas lignocelulósicas.

Resumen de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona una célula que es capaz de realizar fermentación, tal como fermentación alcohólica, y de usar xilosa como fuente de carbono. Tal célula comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa, donde la secuencia de aminoácidos de la xilosa isomerasa tiene al menos 90% de identidad en secuencia con la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 2 y donde la secuencia de nucleótidos es heteróloga al huésped. Tal célula produce una cantidad mayor de etanol cuando utiliza xilosa como fuente de carbono en comparación con el hongo filamentoso de tipo silvestre.

La invención también proporciona:

- un proceso para producir un producto de fermentación poceso que comprende fermentar un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula de la invención de tal manera que la célula fermente la xilosa al producto de fermentación;
- un proceso para producir un producto de fermentación proceso que comprende fermentar un medio que contiene al menos una fuente de xilosa y una fuente de L- arabinosa con una célula tal como se define en la invención el cual es capaz de utilizar L-arabinosa de tal manera que la célula fermente la xilosa y la L-arabinosa hasta el producto de fermentación; y
- un proceso para producir un producto de fermentación proceso que comprende fermentar un medio que contiene al menos una fuente de xilosa y una fuente de L-arabinosa con una célula de la invención y una célula capaz de utilizar L-arabinosa mediante lo cual cada célula fermenta xilosa y/o arabinosa hasta el producto de fermentación.

En una realización, la célula comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa obtenible a partir de una célula del gen *Clostridium*, por ejemplo, a partir de una célula de *Clostridium beijerinckii*. En una realización, el nucleótido puede ser de cepa natural o de codón optimizado o de par de codones optimizado.

La invención proporciona adicionalmente el uso de una célula de la invención en un proceso para la producción de un producto de fermentación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 define el mapa de plásmidos de p427-TEF que codifica la xilosa isomerasa de *Clostridium beijerinckii*

para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. La CpO denota el par de codones optimizados.

La figura 2 define una curva de crecimiento de BIE104P1 transformada con pPWT215 sobre xilosa al 2% como única fuente de carbono y de la cepa de referencia transformada sin ADN en el plásmido (transformación de control). Los números "1" y "2" indican la transferencia de una alícuota del cultivo a medio fresco. Se incubaron todos los cultivos en presencia de aire, excepto el último (después de la segunda transferencia).

La figura 3 representa curvas de crecimiento de la cepa BIE292XI (*C. beyerinckii*) (línea negra) y una cepa de control (línea gris) del ejemplo 6.

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de la xilosa isomerasa de par de codones optimizados de *Clostridium beijerinckii.*

SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos de la xilosa isomerasa de *Clostridium beijerinckii.*

SEQ ID NO: 2 representa la secuencia del cebador directo.

SEQ ID NO. 4 representa la secuencia del cebador inverso.

Descripción detallada de la invención

A lo largo de la presente especificación y en las reivindicaciones acompañantes las palabras "comprenden", "incluyen" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" deben interpretarse de forma inclusiva. Esto es, estas palabras pretenden abarcar la posible inclusión de otros elementos o enteros no específicamente descritos, donde el contexto lo permita.

La invención se relaciona con una célula que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa, donde la secuencia de aminoácidos de la xilosa isomerasa tiene al menos 90% de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 y donde la secuencia de nucleótidos es heteróloga al huésped.

La presencia de la secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa confiere a la célula la capacidad de isomerizar xilosa hasta xilulosa.

Una "xilosa isomerasa" (EC 5.3.1.5) se define aquí como una enzima que cataliza la isomerización directa de D-xilosa en D-xilulosa y/o viceversa. La enzima también es conocida como D-xilosa cetoisomerasa. Una xilosa isomerasa aquí también puede ser capaz de catalizar la conversión entre el D-glucosa y D-fructosa (y de acuerdo con lo anterior también puede ser denominada como glucosa isomerasa). Una xilosa isomerasa aquí puede requerir un catión bivalente, tal como magnesio, manganeso o cobalto como cofactor.

De acuerdo con lo anterior, una célula de la invención es capaz de isomerizar xilosa a xilulosa. La capacidad de isomerizar xilosa a xilulosa es conferida sobre la célula huésped por transformación de la célula huésped con un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una xilosa isomerasa definida. Una célula de la invención isomeriza la xilosa en xilulosa mediante la isomerización directa de xilosa a xilulosa. Se entiende que esto significa que la xilosa es isomerizada en xilulosa en una reacción sencilla catalizada por una xilosa isomerasa, en oposición a la conversión en dos etapas de la xilosa a xilulosa a través de un intermedio xilitol y catalizado por la xilosa reductasa y el xilitol deshidrogenasa, respectivamente.

Una unidad (U) de actividad de xilosa isomerasa puede definirse aquí como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de xilulosa por minuto, bajo condiciones como las descritas por Kuyper et al. (2003, FEMS Yeast Res. 4: 69 – 78).

La célula de la invención se define con referencia a una xilosa isomerasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad en la secuencia a la misma. De la misma forma, una célula de la invención puede definirse con referencia a una xilosa isomerasa como una secuencia de nucleótidos que codifica tal secuencia de aminoácidos.

SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos de la xilosa isomerasa de *Clostridium beijerinckii.* Una célula de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa que tiene los aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o uno que tiene al menos 90% de identidad en secuencia a la misma.

Preferiblemente, una célula de acuerdo con la presente invención es una célula que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa que tienen una secuencia que tiene al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% o al menos aproximadamente 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos

97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Una célula de acuerdo con la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifique una xilosa isomerasa que tenga una secuencia que presente al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% o al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencias con la secuencia de ácidos nucleicos indicada en la SEC. ID. NO: 1.

La identidad en secuencia (o similitud en secuencia) se define aquí como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptidos o proteínas) o dos o más secuencias en ácidos nucleicos (polinucleótidos), según se determina por comparación de las secuencias. Usualmente, las identidades o similitudes en secuencias se comparan, típicamente en toda la longitud de las secuencias comparadas. Sin embargo, las secuencias pueden ser comparadas en ventanas de comparación más cortas. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea el caso, tal como se determina por la comparación entre segmentos de tales secuencias.

Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas de ordenador públicamente disponibles. Los métodos de programas de ordenador preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias, incluyen por ejemplo, el BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990), disponibles públicamente en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894). Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de aminoácidos utilizando BLASTP son la abertura de espacios 11.0, extensión de espacios 1, matriz Blosum 62. Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos utilizando BLASTP son abertura de espacio 11.0, extensión de espacio 1, matriz completa de ADN (matriz de identidad de ADN).

Opcionalmente, al determinar el grado de similitud de aminoácidos, la persona experimentada en la técnica también puede tener en cuenta las así llamadas sustituciones “conservadoras” de aminoácidos, como será evidente para la persona experimentada en la técnica.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la posibilidad de intercambio de residuos que tengan cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales con hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina, y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina.

Grupos de sustitución conservadora de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Variantes de sustitución de las secuencias de aminoácidos aquí divulgadas son aquellas en las cuales al menos un residuo en las secuencias divulgadas ha sido eliminado y se inserta un residuo diferente en su lugar. Preferiblemente, el cambio de aminoácido es conservador. Las sustituciones conservadoras preferidas para cada uno de los aminoácidos de origen natural es como sigue: Ala a ser; Arg a lys; Asn a gln o his; Asp a glu; Cys a ser o ala; Gln a asn; Glu a asp; Gly a pro; His a asn o gln; He a leur o val; Leu a ile o val; Lys a arg; gln o glu; Met a leu o ile; Phe a met, leu o tyr; Ser a thr; Thr a ser; Trp a tyr; Tyr a trp o phe; y, Val a ile o leu.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de xilosa a xilulosa de acuerdo con la invención también puede definirse por su capacidad de hibridizar con las secuencias de nucleótidos que codifican la enzima que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la misma, bajo condiciones de hibridización moderadas, o preferiblemente estrictas.

Formalmente, tales secuencias de nucleótidos hibridizan con el complemento reverso de las secuencias de nucleótidos que codifican la enzima que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo secuencias que hibridizan con el complemento reverso de SEQ ID NOs: 1 o 2.

Las condiciones de hibridización estrictas se definen aquí como condiciones que permiten que una secuencia de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente 25, de forma preferible aproximadamente 50 nucleótidos, 75 o 100 y lo más preferiblemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos, hibridice a una temperatura de aproximadamente 65ºC en una solución que comprende aproximadamente una sal 1 M, preferiblemente 6 x SSC (cloruro de sodio, citrato de sodio) o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y lavar a 65ºC en una solución que comprende aproximadamente sal 0.1 M, o menos, preferiblemente 0,2 x SSC o cualquier otra

solución que tenga fuerza iónica comparable. Preferiblemente, la hibridización se lleva a cabo durante la noche, esto es durante al menos 10 horas y preferiblemente el lavado se lleva a cabo durante al menos una hora con al menos dos cambios de la solución de lavado. Estas condiciones permitirán normalmente la hibridización específica de secuencias que tengan aproximadamente 90% o más de identidad de secuencia.

Condiciones moderadas se definen aquí como condiciones que permiten que secuencias de ácidos nucleicos de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos, hibridicen a una temperatura de aproximadamente 45ºC en una solución que comprende sal aproximadamente 1 M, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y lavado a temperatura ambiente a una solución que comprende sal a aproximadamente 1 M, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Preferiblemente, la hibridización se lleva a cabo durante la noche, esto es al menos durante 10 horas, y preferiblemente el lavado se lleva a cabo durante al menos una hora con al menos dos cambios de la solución de lavado. Estas condiciones permitirán usualmente la hibridización específica de secuencias que tengan hasta 50% de identidad de secuencia. La persona experimentada en la técnica será capaz de modificar estas condiciones de hibridización con el fin de identificar específicamente secuencias que varían en identidad entre 50% y 90%.

Para incrementar la probabilidad de que la enzima introducida se exprese en forma activa en una célula de la invención, la secuencia de nucleótidos codificante correspondiente puede ser adaptada para optimizar su uso de codón al de la célula de levadura escogida. Se conocen en la técnica varios métodos para optimización de codones. Un método preferido para optimizar el uso de codón de las secuencias de nucleótidos al de la levadura es una tecnología de optimización de pares de codones como se divulga en WO2006/077258 y/o WO2008/000632. La WO2008/000632 apunta a la optimización de pares de codones. La optimización de pares de codones es un método donde las secuencias de nucleótido que codifican un polipéptido se modifican con respecto al uso de codón, en particular a los pares de codones que son utilizados, para obtener una expresión mejorada de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido y/o una producción mejorada del polipéptido codificado. Los pares de codones se definen como un conjunto de dos tripletes subsecuentes (codones) en una secuencia de codificación.

Como una medida simple para la expresión de genes y la eficiencia de la traducción, aquí, se utiliza el Codon Adaptation Index (CAI), tal como se describe en Xuhua Xia, Evolutionary Bioinformatics 2007, 3: 53 – 58. El índice utiliza un conjunto de referencia de genes altamente expresados a partir de una especie para establecer los méritos relativos de cada codón, y una marcación para un gen se calcula a partir de una frecuencia de uso de todos los codones en ese gen. El índice establece el grado al cual la selección ha sido efectiva en el moldeo del patrón del uso de codón. En este respecto es útil predecir el nivel de expresión de un gen, para establecer la adaptación de genes virales a sus huéspedes, y para hacer comparaciones del uso de codón en los diferentes organismos. El índice también puede dar una indicación aproximada del éxito probable de la expresión del gen heterólogo. En los genes optimizados con par de codones de acuerdo con la invención el CAI es 0.6 o más, 0.7 o más, 0.8 o más, 0.85 o más, 0.87 o más, 0.90 o más, 0.95 o más, o aproximadamente 1.0.

En una célula de la invención, la xilosa isomerasa es típicamente heteróloga hacia la célula. Es decir, la xilosa isomerasa tiene una secuencia que no se presenta de forma natural en la célula en cuestión como parte del organismo, célula, genoma de ADN o secuencia de ARN en el cual está presente. Es decir, la xilosa isomerasa es exógena a la célula o no se presenta de forma natural en la célula. De acuerdo con lo anterior, una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa se expresa típicamente o es capaz de ser expresada en forma activa en la célula huésped transformada.

Una célula de la invención es por lo tanto una célula que comprende, esto es que ha sido transformada con, un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la xilosa isomerasa como se definió anteriormente. El constructo de ácido nucleico que comprende la xilosa isomerasa que codifica la secuencia preferiblemente es capaz de la expresión de la xilosa isomerasa de la célula huésped.

Los métodos para expresar una secuencia heteróloga de xilosa isomerasa en una célula son bien conocidos para los expertos en la técnica.

De acuerdo con lo anterior, una célula de la invención es una célula recombinante. Es decir, una célula de la invención comprende, o se transforma con o está genéticamente modificada con una secuencia de nucleótidos que no se presenta en forma natural en la célula en cuestión.

Las técnicas para la expresión recombinante de la xilosa isomerasa en una célula, así como las modificaciones genéticas adicionales de una célula de la invención son bien conocidas para las personas experimentadas en la técnica. Típicamente tales técnicas involucran la transformación de una célula con un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia relevante. Tales métodos son conocidos, por ejemplo, a partir de manuales estándar, tales como Sambrook and Russel (2001) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, o F. Ausubel et al., eds., “Current protocols in molecular biology”, Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Los métodos para transformación y modificación genética de células huésped fúngicas son bien conocidos a partir por ejemplo de EP-A- 0635 574, WO 98/46772, WO 99/60102, WO 00/37671, WO 90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 y US 6,265,186.

La mayor parte de los plásmidos episomales o 2µ son relativamente inestables, perdiéndose en aproximadamente 10^{-2} o más células después de cada generación. Incluso bajo condiciones de crecimiento selectivo, solamente el 60% al 95% de las células retienen el plásmido episomal. El número de copias de la mayoría de los plásmidos episomales varía de 10-40 por célula de huéspedes cir^{+}. Sin embargo, los plásmidos no se distribuyen igualmente entre las células, y hay una alta varianza en el número de copias por célula en poblaciones. Las cepas transformadas con plásmidos integrantes son extremadamente estables, aún en ausencia de presión selectiva. Sin embargo la pérdida de plásmidos puede ocurrir a aproximadamente 10^{-3} hasta 10^{-4} frecuencias por recombinación homóloga entre ADN repetido en tándem, llevando a la apertura de circuito de la secuencia de vectores. Preferiblemente, el diseño del vector en el caso de la integración estable es de tal forma que por pérdida de los genes marcadores de selección (lo que también ocurre por recombinación homóloga intramolecular) la apertura del circuito constructo integrado no es posible. Preferiblemente los genes se integran así de forma estable. La integración estable se define aquí como la integración en el genoma, donde la apertura de circuito del constructo integrado no es posible. Preferiblemente los marcadores de selección están ausentes.

Típicamente, el constructo de ácidos nucleicos puede ser un plásmido, por ejemplo un plásmido de copia baja o un plásmido de copia alta. La célula de acuerdo con la presente invención puede comprender copias sencillas o múltiples de la secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa, por ejemplo por copias múltiples de un constructo de nucleótidos o por uso de un constructo que tiene copias múltiples de la secuencia de xilosa isomerasa.

El constructo de ácidos nucleicos puede ser mantenido de forma episomal y así comprender una secuencia de replicación autónoma, tal como una secuencia de replicación autosómica. Un constructo de ácido nucleico episomal adecuado puede por ejemplo, basarse en los plásmidos de levadura 2µ o pKD1 (Gleer et al., 1991, Biotechnology 9: 968-975), o el plásmido AMA (Fierro et al., 1995, Curr Genet 29: 482-489). Como alternativa, cada constructo de ácido nucleico puede integrarse en una o más copias en el genoma de la célula. La integración en el genoma de la célula puede ocurrir aleatoriamente por recombinación no homologa pero preferiblemente, el constructo de ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la célula mediante recombinación homóloga como es bien conocido en la técnica (véase por ejemplo WO 90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635 574 y US 6,265,186).

Típicamente, la secuencia que codifica la xilosa isomerasa estará enlazada de forma operable a una o más secuencias de ácidos nucleicos, capaces de proveer o ayudar en la transcripción y/o traducción de la secuencia de xilosa isomerasa.

El término “enlazado de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en la forma prevista. Por ejemplo, un promotor o potenciador está enlazado de forma operativa a una secuencia de codificación de dicho promotor o potenciador que afecta la transcripción de la secuencia de codificación.

Tal como se usa aquí, el término “promotor” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, localizado corriente arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen, y está identificado estructuralmente mediante la presencia de un sitio de enlace para polimerasa de ARN dependiente de ADN, sitio de iniciación de la transcripción y otras secuencias de ADN conocidas para los expertos en la técnica. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo.

El promotor que pudiera ser utilizado para alcanzar la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifican una enzima de acuerdo con la presente invención pueden ser no nativo para la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima que va a ser expresada, esto es, un promotor que es heterólogo a la secuencia de nucleótidos (secuencia de codificación) a la cual está enlazado operativamente. El promotor puede, sin embargo, ser homólogo, esto es endógeno a la célula huésped.

Promotores adecuados en este contexto incluyen tanto promotores naturales constitutivos como inducibles así como promotores manipulados genéticamente, que son bien conocidos para las personas experimentadas en la técnica. Promotores adecuados en células huésped eucariotas pueden ser *GAL7, GAL10, o GAL1, CYC1, HIS3, ADH1, PGL, PH05, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO1, TPI1, y AOX1.* Otros promotores adecuados incluyen *PDC1, GPD1, PGK1, TEF1 y TDH3.*

Una célula de la invención, el extremo 3´de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la xilosa isomerasa esta preferiblemente enlazado de forma operativa a una secuencia terminadora de la transcripción. Preferiblemente la secuencia terminadora es operable en una célula huésped seleccionable, tal como por ejemplo la especie de levadura seleccionable. En cualquier caso la selección del terminador no es crítica; puede ser, por ejemplo de cualquier gen de levadura, aunque los terminadores algunas veces pueden trabajar si provienen de un gen eucariota no levadura. Usualmente, una secuencia de nucleótidos que codifican la xilosa isomerasa comprende un terminador. Preferiblemente, tales terminadores están combinados con mutaciones que evitan el no sentido mediado por la disminución de ARNm en la célula huésped de la invención (véase por ejemplo: Shirley et al., 2002, Genetics 161: 1465 – 1482).

La secuencia de terminación de la transcripción comprende de manera preferible adicionalmente una señal de poliadenilación.

Opcionalmente, puede estar presente un marcador seleccionable en un constructo de ácido nucleico adecuado para su uso en la invención. Tal como se usa aquí, el término “marcador” se refiere a un gen que codifica un trecho o un fenotipo que permite la selección de, o escoger, una célula huésped que contiene el marcador. El gen marcador puede ser un gen de resistencia a antibióticos donde puede utilizarse el antibiótico apropiado para seleccionar las células transformadas entre células que no están transformadas. Ejemplo de marcadores de resistencia a antibióticos adecuados incluye, por ejemplo, dihidrofolato reductasa, higromicin-B-fosfotransferasa, 3´-O-fosfotransferasa II (resistencia a kanamicina, neomicina y G418). Aunque los marcadores de resistencia a los antibióticos pueden ser los más convenientes para la transformación de células huésped polipoides, preferiblemente sin embargo se utilizan marcadores de no resistencia a antibióticos, tales como marcadores auxotróficos (*URA3, TRPI, LEU2*) o el gen S. pombe *TPI* (descrito por Russell P R, 1985, Gene 40: 125 – 130). En una realización preferida las células huésped transformadas con los constructos del ácido nucleico son libres de genes marcadores. Los métodos para construir las células huésped microbianas libres de genes marcadores recombinantes se describen en EP-A-O 635 574 y se basan en el uso de marcadores bidireccionales tales como el gen de A. nidulans amdS (acetamidasa) y los genes de levadura *URA3* y *LYS2*. Como alternativa, puede incorporarse un marcador seleccionable tal como Proteína Verde Fluorescente, lacL, luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa, beta-glucoronidasa, en los constructos de ácido nucleico de la invención permitiendo seleccionar las células transformadas.

Pueden estar presentes elementos adicionales opcionales en los constructos de ácido nucleico adecuados para su uso en la invención que incluyen, pero no se limitan a, uno o más secuenciadores de guía, potenciadores, factores de integración y/o genes reportadores, secuencias de intrones, centrómeros, telómeros y/o secuencias de unión a matrices (MAR). Los constructos de ácidos nucleicos de la invención pueden comprender adicionalmente una secuencia para replicación autónoma, tal como una secuencia ARS.

Preferiblemente, la xilosa isomerasa se expresa en el citosol. La expresión citosólica puede ser alcanzada mediante eliminación o modificación de una señal de objetivo mitocondrial o peroxisomal.

Una célula de la invención puede ser cualquier célula adecuada, tal como una célula procariota, tal como una bacteria, o una célula eucariota. Típicamente, la célula será una célula eucariota, por ejemplo una levadura o un hongo filamentoso.

Las levaduras se definen aquí como microorganismos eucariotas e incluyen todas las especies de la subdivisión Eumicotina (Alexopoulos, C. J., 1962, In: Introductory Mycology, John Wiley & Sons, Inc., New York) que crecen predominantemente en forma unicelular.

Las levaduras pueden crecer bien por fusión de un talus unicelular o pueden crecer por fisión del organismo. Una levadura preferida como célula de la invención puede pertenecer a los géneros *Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Pichia, Schizosaccharomyces, Hansenula, Kloeckera, Schwanniomyces* o *Yarrowia*. Preferiblemente la levadura es capaz de fermentación anaeróbica, más preferiblemente capaz de fermentación anaeróbica alcohólica.

Los hongos filamentosos se definen aquí como microorganismos eucariotas que incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumicotina. Estos hongos son caracterizados por un micelio vegetativo compuesto de quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos.

Los hongos filamentosos adecuados para su uso como células de la presente invención son morfológica, fisiológica y genéticamente distintos de las levaduras. Las células de hongos filamentosos pueden ser utilizadas ventajosamente ya que la mayor parte de los hongos no requieren condiciones estériles para su propagación y son insensibles a infecciones de bacteriófagos. El crecimiento vegetativo por parte de los hongos filamentosos es por elongación del hifen y el catabolismo de carbono de la mayoría de los hongos filamentosos es obligatoriamente aeróbico. Los hongos filamentosos preferidos como células huésped de la invención pueden pertenecer a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma, Humicola, Acremoniurra, Fusarium* o *Penicillum*. Más preferiblemente, la célula fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillum chrysogenum*, o *Rhizopus oryzae*.

A lo largo de los años se han hecho sugerencias para la introducción de diversos organismos para la producción de bioetanol a partir de azúcares de cultivo. En la práctica, sin embargo, todos los procesos de producción de bioetanol principales han continuado con el uso de levaduras del género *Saccharomyces* como productores de etanol. Esto se debe a los muchos rasgos atractivos de la especie *Saccharomyces* para los procesos industriales, esto es, una tolerancia alta a los ácidos, al etanol y a la osmosis, capacidad de crecimiento anaeróbico, y desde luego su alta capacidad fermentativa alcohólica. Las especies de levadura preferidas como células huésped incluyen *S. cerevisiae, S. bulderi, S. barnetti, S. exiguus, S. uvarum*, *S. diastaticus, K. lactis, K. marxianus* o *K. fragilis*.

Una célula de la invención puede ser capaz de convertir biomasas de vegetales, celulosas, hemicelulosas, pectinas, ramnosa, galactosa, fucosa, maltosa, maltodextrinas, ribosa, ribulosa o almidón, derivados del almidón, sacarosa, lactosa y glicerol, por ejemplo en azúcares fermentables. De acuerdo con lo anterior, una célula de la invención

puede expresar una o más enzimas tales como celulasa (una endocelulasa o una exocelulasa), una hemicelulasa (una endo o exo xilanasa o arabinasa) necesarias para la conversión de la celulosa en monómeros de glucosa y de la hemicelulosa en monómeros de xilosa y arabinosa, una peptinasa capaz de convertir las peptinas en ácido glucurónico y ácido galacturónico o una amilasa para convertir el almidón en monómeros de glucosa.

Una célula de la invención es preferiblemente un huésped capaz de un transporte activo o pasivo de xilosa hacia la célula.

Preferiblemente, una célula de la invención:

es capaz de glicolisis activa; y/o

muestra flujo a través de la ruta de la pentosa fosfato; y/o

despliega actividad de xilulosas quinasa de manera que la xilulosa isomerizada a partir de la xilosa puede ser metabolizada hasta piruvato.

La célula adicionalmente comprende de forma preferible aquellas actividades enzimáticas requeridas para la conversión de piruvato a un producto de fermentación deseado, tal como etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propano diol, etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama o cefalosporina.

Una célula preferida de la invención es una célula que sea capaz de forma natural de fermentación alcohólica, preferiblemente, fermentación alcohólica anaeróbica. Una célula de la invención preferiblemente tiene una alta tolerancia al etanol, una alta tolerancia a un pH bajo (por ejemplo es capaz de crecer a un pH inferior a aproximadamente 5, a aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2.5) y hacia ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico y/o a productos de degradación del azúcar tales como furfural e hidroxi metil furfural y/o una alta tolerancia a temperaturas elevadas.

Cualquiera de las características o actividades anteriores de una célula de la invención pueden estar presentes de forma natural en la célula o pueden ser introducidas o modificadas por modificación genética.

La secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa se expresa típicamente o es capaz de ser expresada en forma activa en la célula huésped transformada. Así, la expresión de la secuencia de nucleótidos en la célula huésped produce una xilosa isomerasa activa, típicamente con una actividad específica de al menos aproximadamente 10 U de actividad de xilosa isomerasa por mg de proteína a aproximadamente 30ºC, preferiblemente al menos a aproximadamente 20, a al menos aproximadamente 25, a al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 750 o al menos aproximadamente 1.000 U por mg a aproximadamente 30ºC. La actividad específica de la xilosa isomerasa expresada en la célula huésped transformada se define aquí como la cantidad de actividad de xilosa isomerasa en unidades por mg de proteína de lisado libre de la célula huésped, por ejemplo un lisado libre de célula de levadura. La determinación de la actividad de la xilosa isomerasa, cantidad de proteína y preparación del lisado libre de células son como se describe aquí. Preferiblemente, la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifican la xilosa isomerasa en la célula huésped produce una xilosa isomerasa con un K_m para la xilosa que es menor de 50, 40, 30 o 25 mM, más preferiblemente, el K_m para la xilosa es aproximadamente 20 mM o menos.

Una célula de la invención puede comprender una o más modificaciones genéticas que incrementan el flujo de la ruta del fosfato de pentosa. En particular, las modificaciones genéticas pueden llevar a un flujo incrementado a través de la parte de la ruta de fosfato de pentosa no oxidativa. Una modificación genética que produce un flujo incrementado de la parte no oxidativa de la ruta del fosfato de pentosa se entiende aquí como una modificación que incrementa el flujo en al menos un factor de aproximadamente 1.1, aproximadamente 1.2, aproximadamente 1.5, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10 o aproximadamente 20 en comparación con el flujo en una cepa que es genéticamente idénticas excepto por la modificación genética que causa el flujo incrementado. El flujo de la parte no oxidativa de la ruta del fosfato de pentosa puede medirse haciendo crecer el huésped modificado sobre xilosa como única fuente de carbono, determinando la tasa de consumo específica de xilosa y sustrayendo la tasa de producción de xilitol específica de la tasa de consumo de xilosa específica, si se produce xilitol. Sin embargo, el flujo de la parte no oxidativa de la ruta del fosfato de pentosa es proporcional con la tasa de crecimiento sobre xilosa como fuente única de carbono, preferiblemente con una tasa de crecimiento anaeróbica sobre xilosa como única fuente de carbono. Hay una relación lineal entre la tasa de crecimiento sobre xilosa como fuente única de carbono (μ_{max}) y el flujo de la parte no oxidativa de la ruta del fosfato de pentosa. La tasa de consumo específica de xilosa (Qs) es igual a la tasa de crecimiento (μ) dividida por el rendimiento de biomasa sobre azúcar (Y_{xs}) porque el rendimiento de biomasa sobre azúcar es constante (bajo un conjunto dado de condiciones: anaeróbico, medio de crecimiento, pH, fondo genético de la cepa, etc.; esto es $Qs = \mu / Y_{xs}$). Por lo tanto el flujo incrementado de la parte no oxidativa de la ruta de fosfato de pentosa puede deducirse a partir del incremento en la tasa de crecimiento máximo bajo estas condiciones a menos que el transporte (el consumo es limitante).

Una o más modificaciones genéticas que incrementan el flujo de la ruta del fosfato de pentosa puede introducirse en

la célula huésped de diversas maneras. Estas incluyen por ejemplo, alcanzar niveles de actividad en un estado de equilibrio más alto de la xilulosa quinasa y/o una o más de las enzimas de la parte de la ruta no oxidativa del fosfato de pentosa y/o un nivel de estado de equilibrio reducido de la actividad no específica de la aldosa reductasa. Estos cambios en los niveles de actividad del estado de equilibrio pueden efectuarse mediante selección de mutantes (espontáneos o inducidos por productos químicos o radiación) y/o por tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, por sobreexpresión o inactivación, respectivamente, de los genes que codifican las enzimas o factores que regulan estos genes.

En una célula huésped preferida, la modificación genética comprende la sobreexpresión de al menos una enzima de la ruta (parte no oxidativa) del fosfato de pentosa. Preferiblemente la enzima se selecciona del grupo que consiste de las enzimas que codifican para la ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa y transaldolasa. Pueden sobreexpresarse diversas combinaciones de enzimas de la ruta (parte no oxidativa) del fosfato de pentosa. Por ejemplo las enzimas que son sobreexpresadas pueden ser al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa y ribulosa-5-fosfato epimerasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa y transcetolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato epimerasa y transcetolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato epimerasa y transaldolasa; o al menos las enzimas transcetolasa y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa, transcetolasa y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa y transcetolasa. En una realización de la invención cada una de las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa y transaldolasa, están sobreexpresadas en la célula huésped. Se prefiere más una célula huésped en la cual la modificación genética comprende al menos la sobreexpresión de las dos enzimas transcetolasa y transaldolasa y como tales una célula huésped ya es capaz de un crecimiento anaeróbico sobre xilosa. En efecto, bajo algunas condiciones las células huésped que sobreexpresan solamente la transcetolasa y la transaldolasa tienen ya la misma velocidad de crecimiento anaeróbico sobre xilosa que las células huésped que sobreexpresan todas las cuatro enzimas, esto es, la ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa y transaldolasa. Además, las células huésped que sobreexpresan las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa y ribulosa-5-fosfato epimerasa se prefieren sobre las células huésped que sobreexpresan solamente la isomerasa o solamente la epimerasa puesto que la sobreexpresión de solamente una de estas enzimas puede producir desbalances metabólicos.

La enzima “ribulosa-5-fosfato epimerasa” (EC 5.1.3.1) se define aquí como una enzima que cataliza la epimerisación de D-xilulosa 5-fosfato en D-ribulosa 5-fosfato y viceversa. La enzima también se conoce como fosforribulosa epimerasa; eritrosa-4-fosfato isomerasa; fosfocetopentosa 3-epimerasa; xilulosa fosfato 3-epimerasa; fosfocetopentosa epimerasa; ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa; D-ribulosa fosfato-3-epimerasa; D-ribulosa 5-fosfato epimerasa; D-ribulosa 5-P 3-epimerasa; D-xilulosa-5-fosfato 3-epimerasa; pentosa-5-fosfato 3-epimerasa; o D-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa. Una ribulosa 5-fosfato epimerasa puede definirse adicionalmente por su secuencia de aminoácidos. De la misma forma una ribulosa 5-fosfato epimerasa puede definirse por una secuencia de nucleótidos que codifique la enzima así como por una secuencia de nucleótidos que hibridice a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifique una ribulosa 5-fosfato epimerasa. La secuencia de nucleótidos que codifica para la ribulosa 5-fosfato epimerasa se designa aquí como *RPE1*.

La enzima “ribulosa 5-fosfato isomerasa” (EC 5.3.1.6) se define aquí como una enzima que cataliza la isomerización directa de la D-ribosa 5-fosfato en D-ribulosa 5-fosfato y viceversa. La enzima también es conocida como fosfopentoisomerasa; fosforriboisomerasa; ribosa fosfato isomerasa; 5-fosforribosa isomerasa; D-ribosa 5-fosfato isomerasa; D-ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa; o D-ribosa-5-fosfato aldosa-cetosa-isomerasa. Una ribulosa 5-fosfato isomerasa puede ser definida adicionalmente por secuencia de aminoácidos. De la misma forma una ribulosa 5-fosfato isomerasa puede ser definida por una secuencia de nucleótidos que codifique la enzima así como por una secuencia de nucleótidos que hibridice a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifique una ribulosa 5-fosfato isomerasa. La secuencia de nucleótidos que codifique para una ribulosa 5-fosfato isomerasa se designa aquí como *RPI1*.

La enzima “transcetolasa” (EC 2.2.1.1) se define aquí como una enzima que cataliza la reacción: D-ribosa 5-fosfato + D-xilulosa 5-fosfato <-> sedoheptulosa 7-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato y viceversa. La enzima también es conocida como glicolaldehídotransferasa o sedoheptulosa-7-fosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato glicolaldehídotransferasa. Una transcetolasa puede definirse adicionalmente por sus aminoácidos. De la misma forma una transcetolasa puede definirse por una secuencia de nucleótidos que codifique la enzima así como por una secuencia de nucleótidos que hibridice a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifiquen una transcetolasa. La secuencia de nucleótidos que codifica para una transcetolasa se designa aquí como *TKL1*.

La enzima “transaldolasa” (EC 2.2.1.2) se define aquí como una enzima que cataliza la reacción: sedoheptulosa 7-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato <-> D-eritrosa 4-fosfato + D-fructosa 6-fosfato y viceversa. La enzima también es conocida como dihidroxiacetonatransferasa; dihidroxiacetona sintasa; formaldehído transcetolasa; o sedoheptulosa-7-fosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato gliceronatransferasa. Una transaldolasa puede definirse adicionalmente por su secuencia de aminoácidos. De la misma forma una transaldolasa puede definirse mediante una secuencia de nucleótidos que codifiquen la enzima así como con una secuencia de nucleótidos que hibridicen a una secuencia de

nucleótidos de referencia que codifiquen una transaldolasa. La secuencia de nucleótidos que codifica para la transcetolasa se designa aquí como *TAL1*.

Diversos medios son conocidos por los expertos en la técnica para la expresión y sobreexpresión de enzimas en una célula de la invención. En particular, una enzima puede ser sobreexpresada incrementando el número de copias del gen que codifica la enzima en la célula huésped, por ejemplo, integrando copias adicionales del gen en el genoma de la célula huésped, expresando el gen por un vector de expresión multicopias episomal o introduciendo un vector de expresión episomal que comprenda múltiples copias del gen.

Como alternativa, la sobreexpresión de las enzimas en las células huésped de la invención puede alcanzarse utilizando un promotor que no sea nativo a la secuencia que codifique para la enzima que va a ser sobreexpresada, esto es un promotor que sea heterólogo a la secuencia de codificación a la cual esta enlazado de forma operativa. Aunque el promotor preferiblemente es heterólogo a la secuencia de codificación a la cual está enlazado de forma operativa, también se prefiere que el promotor sea homólogo, esto es endógeno a la célula huésped. Preferiblemente el promotor heterólogo es capaz de producir un nivel de estado de equilibrio más alto del transcrito que comprende la secuencia de codificación (o es capaz de producir más moléculas transcritas, esto es, moléculas de ARNm, por unidad de tiempo) que el promotor que es nativo para la secuencia de codificación, preferiblemente bajo condiciones donde la xilosa o la xilosa y la glucosa están disponibles como fuentes de carbono, más preferiblemente como fuentes de carbono principales (esto es más del 50% de la fuente de carbono disponible consiste de xilosa o xilosa y glucosa), lo más preferiblemente como fuentes únicas de carbono. Los promotores adecuados en este contexto incluyen tanto promotores constitutivos como inducibles naturales así como promotores manipulados. Un promotor preferido para su uso en la presente invención será además insensible a la represión del catabolito (glucosa) y/o preferiblemente no requerirá xilosa para su inducción. Los promotores que tienen estas características están ampliamente disponibles y son conocidos para las personas experimentadas en la técnica. Ejemplos adecuados de tales promotores incluyen por ejemplo promotores de genes glicolíticos, tales como la fosfofructoquinasa (PFK), triosa fosfato isomerasa (TPI), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD, TDH3 o GAPDH), piruvato quinasa (PYK), fosfogliceratoquinasa (PGK) como promotores de levaduras u hongos filamentosos; más detalles acerca de tales promotores provenientes de levaduras pueden ser encontrados en (WO 93/03159). Otros promotores útiles son proteínas ribosomales que codifican promotores de genes, el promotor de gen lactasa (LAC4), promotores de alcohol deshidrogenasa (ADHI, ADH4, y similares), y el promotor enolasa (ENO). Otros promotores, tanto constitutivos como inducibles, y potenciadores o secuencias de activación de corriente arriba serán conocidos para los expertos en la técnica. Los promotores utilizados en las células huésped de la invención pueden ser modificados, si se desea, para afectar sus características de control.

La secuencia de codificación utilizada para la sobreexpresión de las enzimas mencionadas más arriba puede ser preferiblemente homóloga a la célula huésped de la invención. Sin embargo, pueden usarse secuencias de codificación que sean heterólogas a la célula huésped de la invención.

La sobreexpresión de una enzima, cuando se refiere a la producción de la enzima en una célula huésped genéticamente modificada, significa que la enzima se produce en un nivel más alto de actividad enzimática específica en comparación con la célula huésped no modificada bajo condiciones idénticas. Usualmente esto significa que la proteína activa enzimáticamente (o proteínas en el caso de enzimas multisubunidades) se producen cantidades mayores, o mejor a un nivel de estado de equilibrio más alto en comparación con la célula huésped no modificada bajo condiciones idénticas. De la misma forma esto significa usualmente que el ARNm que codifica para la proteína enzimáticamente activa se produce en cantidades mayores, o de nuevo en un nivel de estado de equilibrio más alto en comparación con la célula huésped no modificada bajo condiciones idénticas. La sobreexpresión de una enzima se determina así preferiblemente midiendo el nivel de la actividad específica de la enzima en la célula huésped utilizando ensayos enzimáticos apropiados tal como se describen aquí. Como alternativa, la sobreexpresión de la enzima puede determinarse indirectamente cuantificando el nivel de estado de equilibrio específico de la proteína enzimática, por ejemplo, utilizando anticuerpos específicos para la enzima o cuantificando el nivel de estado de equilibrio específico del ARNm que codifica para la enzima. Esto último puede ser particularmente adecuado para enzimas de la ruta del fosfato de pentosa para la cual los ensayos enzimáticos no son fácilmente factibles como sustratos para las enzimas y no son comercialmente disponibles. Preferiblemente, en una célula huésped de la invención, una enzima que va a ser sobreexpresada es sobreexpresada por al menos un factor de aproximadamente 1.1, aproximadamente 1.2, aproximadamente 1.5, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10 o aproximadamente 20 en comparación con una cepa que sea genéticamente idéntica excepto por la modificación genética que causa la sobreexpresión. Debe entenderse que estos niveles de sobreexpresión pueden aplicarse al nivel de estado de equilibrio de la actividad de la enzima, el nivel de estado de equilibrio de la proteína de la enzima así como el nivel de estado de equilibrio del transcripto que codifica para la enzima.

Una célula de la invención puede comprender una o más modificaciones genéticas para incrementar la actividad específica de la xilulosa quinasa. Preferiblemente la modificación o modificaciones genéticas producen sobreexpresión de una xilulosa quinasa, por ejemplo por sobreexpresión de una secuencia de nucleótidos que codifican una xilulosa quinasa. El gen que codifica la xilulosa quinasa puede ser endógeno a la célula huésped o puede ser una xilulosa quinasa que sea heteróloga a la célula huésped. Una secuencia de nucleótidos usada para sobreexpresión de xilulosa quinasa en la célula huésped de la invención es una secuencia de nucleótidos y codifica

un polipéptido con actividades de xilulosa quinasa.

La enzima “xilulosa quinasa” (EC 2.7.1.17) se define aquí como una enzima que cataliza la reacción ATP + D-xilulosa = ADP + D-xilulosa 5 Fosfato. La enzima también es conocida como xiluloquinasa fosforilante, D-xiluloquinasa o ATP: D-xilulosa 5-fosfotransferasa. Una xilulosa quinasa de la invención puede ser definida adicionalmente por su secuencia de aminoácidos. Probablemente una xilulosa quinasa puede ser definida por una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima así como una secuencia de nucleótidos que hibridiza a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una xilulosa quinasa.

En una célula de la invención, una modificación o modificaciones genéticas que incrementen la actividad específica de la xilulosa quinasa pueden ser combinadas con cualquiera de las modificaciones que incrementen el flujo de la ruta del fosfato de pentosa como se describió más arriba. Sin embargo esto no es esencial.

Así, una célula huésped de la invención puede comprender solamente una modificación o modificaciones genéticas que incrementen la actividad específica de xilulosa quinasa. Los diversos medios disponibles en la técnica para alcanzar y analizar la sobreexpresión de una xilulosa quinasa en la célula huésped de la invención son los mismos que se describieron más arriba para enzimas de la ruta del fosfato de pentosa. Preferiblemente en las células huésped de la invención, una xilulosa quinasa que va a ser sobreexpresada se sobreexpresa por al menos un factor de aproximadamente 1.1, aproximadamente 1.2, aproximadamente 1.5, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10 o aproximadamente 20 en comparación con una cepa que es genéticamente idéntica excepto por las modificaciones genéticas que causan la sobreexpresión. Debe entenderse que estos niveles de sobreexpresión pueden aplicarse al nivel de estado de equilibrio de la actividad de la enzima, el nivel de estado de equilibrio de la proteína de la enzima así como el nivel de estado de equilibrio del transcripto que codifica para la enzima.

Una célula de la invención puede comprender una o más modificaciones genéticas que reduzcan la actividad no específica de la aldosa reductasa en la célula huésped. Preferiblemente, la actividad no específica de la aldosa reductasa es reducir a la célula huésped por una o más modificaciones genéticas que reducen la expresión o inactivan un gen que codifica una aldosa reductasa no específica. Preferiblemente, las modificaciones genéticas reducen o inactivan la expresión de cada copia endógena de un gen que codifica una aldosa reductasa no específica en la célula huésped. Las células huésped pueden comprender copias múltiples de genes que codifican aldosas reductasas no específicas como resultado de un di, poli o aneoploide, y/o la célula huésped puede contener diferentes (iso) enzimas con actividades de aldosa reductasa que difiere en la secuencia de aminoácidos y que son cada una codificada por un gen diferente. También en tales instancias preferiblemente la expresión de cada gen que codifica una aldosa reductasa no específica se reduce o inactiva. Preferiblemente, el gen es inactivado por eliminación de al menos una parte del gen o por interrupción del gen, por lo cual en este contexto el término gen también incluye cualquier secuencia no codificante corriente arriba o corriente debajo de la secuencia de codificación, la eliminación (parcial) o inactivación de las cuales resulta en la reducción de la expresión de la actividad de aldosa reductasa no específica en la célula huésped.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una aldosa reductasa cuya actividad va a ser reducida en la célula huésped de la invención es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de aldosa reductasa.

En las células huésped de la invención, la modificación genética que reduce la actividad no específica de aldosa reductasa en la célula huésped puede combinarse con cualquiera de las modificaciones incrementando el flujo de la ruta del fosfato de pentosa y/o con cualquiera de las modificaciones que incrementan la actividad específica de xilulosa quinasa en las célula huésped como se describió más arriba. Sin embargo, esto no es esencial.

Así, una célula huésped de la invención que comprende solamente una modificación o modificaciones genéticas que reducen la actividad no específica de la aldosa reductasa en la célula huésped se incluye específicamente en la invención.

La enzima “aldosa reductasa” (EC 1.1.1.21) se define aquí como cualquier enzima que sea capaz de reducir la xilosa o xilulosa a xilitol. En el contexto de la presente invención una aldosa reductasa puede ser una aldosa reductasa no específica que sea nativa (endogéna) para una célula huésped de la invención y que sea capaz de reducir la xilosa o xilulosa a xilitol. Las aldosas reductasas no específicas catalizan la reacción:

Aldosa + NAD(P)H + H^+ ↔ alditol + $NAD(P)^+$

La enzima tiene una alta especificidad y también es conocida como aldosa reductasa; poliol dehidrogenasa ($NADP^+$); alditol: NADP óxidorreductasa; alditol: $NADP^+$ 1-óxidoreductasa; NADPH-aldopentosa reductasa; o NADPH- aldosa reductasa.

Un ejemplo particular de tal aldosa reductasa no específica que es endógena a S. cerevisiae y que es codificada por el gen GRE3 (Traff et al.; 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 5668-74). Así, una aldosa reductasa de la invención puede ser definida adicionalmente por su secuencia de aminoácidos. De la misma forma una aldosa reductasa puede ser definida por la secuencia de nucleótidos que codifican la enzima así como una secuencia de nucleótidos

que hibridiza a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una aldosa reductasa.

Una célula de la invención puede adaptarse a la utilización de la xilosa por selección de mutantes, bien espontánea o inducida (por ejemplo por radiación o productos químicos), para el crecimiento sobre xilosa, preferiblemente sobre xilosa como única fuente de carbono, y más preferiblemente bajo condiciones anaeróbicas. La selección de mutantes puede ser llevada a cabo por técnicas que incluyen el paso en serie de cultivos, tal como lo describe por ejemplo, Kuyper et al. (2004, FEMS Yeast Res. 4: 655-664) o por cultivo bajo presión selectiva en un cultivo quimiostático. Una célula huésped preferida de la invención al menos una de las modificaciones genéticas descritas más arriba, incluyendo modificaciones obtenidas por selección de mutantes, confiere a la célula huésped la capacidad de crecer sobre xilosa como fuente de carbono, preferiblemente como única fuente de carbono, y preferiblemente bajo condiciones anaeróbicas. Preferiblemente la célula huésped modificada no produce esencialmente xilitol, por ejemplo, el xilitol producido está por debajo del límite de detección o por ejemplo menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2, aproximadamente 1, aproximadamente 0.5, o aproximadamente 0.3 del carbono consumido sobre una base molar.

Una célula de la invención puede tener la capacidad de crecer sobre xilosa como única fuente de carbono a una tasa de al menos aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.2, aproximadamente 0.25 o aproximadamente 0.3 h^{-1} en condiciones aeróbicas, o, si es aplicable, a una tasa de al menos aproximadamente 0.03, aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.07, aproximadamente 0.08, aproximadamente 0.09, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.12, aproximadamente 0.15 o aproximadamente 0.2 h^{-1} bajo condiciones anaeróbicas. Preferiblemente, la célula huésped modificada tiene la capacidad de crecer sobre una mezcla de glucosa y xilosa (en una relación en peso 1:1) como única fuente de carbono a una tasa de al menos aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.2, aproximadamente 0.25 o aproximadamente 0.3 h^{-1} bajo condiciones aeróbicas, o si es aplicable, a una tasa de al menos aproximadamente 0.03, aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.2, aproximadamente 0.15, o aproximadamente 0.2 h^{-1} bajo condiciones anaeróbicas.

Una célula de la invención puede tener una tasa de consumo de xilosa específica de al menos aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 346, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 750 o aproximadamente 1,000 mg de xilosa//g célula/h. Una célula de la invención puede tener un rendimiento de producto de fermentación (tal como etanol) sobre xilosa que es al menos aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 98 o aproximadamente 99% del rendimiento de la célula huésped de producto de fermentación (tal como etanol) sobre glucosa. Más preferiblemente, el rendimiento de un producto de fermentación (tal como etanol) de una célula de la invención sobre xilosa puede ser igual al rendimiento de la célula en producto de fermentación (tal como etanol) sobre glucosa. De la misma forma, el rendimiento en biomasa de la célula sobre xilosa puede ser al menos aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 98 o aproximadamente 99% del rendimiento de biomasa de la célula huésped sobre glucosa. Más preferiblemente, el rendimiento de biomasa de la célula sobre xilosa puede ser igual al rendimiento de biomasa de la célula huésped sobre glucosa. Se entiende que en comparación con los rendimientos de glucosa y xilosa ambos rendimientos se comparan bajo condiciones aeróbicas o ambos bajo condiciones anaeróbicas.

Una célula de la invención puede ser capaz de utilizar arabinosa. Una célula de la invención puede, por lo tanto, ser capaz de convertir la L-arabinosa en L-ribulosa y/o xilulosa 5-fosfato y/o en un producto de fermentación deseado, por ejemplo uno de los mencionados aquí.

Los organismos, por ejemplo cepas de S. *cerevisiae*, capaces de producir etanol a partir de L-arabinosa pueden ser producidos modificando una célula que introduzca los genes *araA* (L-arabinosa isomerasa), *araB* (L-ribuloquinasa) y *araD* (L-ribulosa-5-P4-epimerasa) a partir de una fuente adecuada. Tales genes pueden ser introducidos en una célula de la invención con el fin de que sea capaz de utilizar la arabinosa. Tal modalidad se describe en WO 2003/095627.

Una célula de la invención puede ser una célula adecuada para la producción de etanol. Una célula de la invención sin embargo, puede ser adecuada para la producción de productos de fermentación o diferentes al etanol. Tales productos de fermentación no etanólica incluyen en principio cualquier producto químico a granel o fino que sea producible por microorganismos eucarióticos tales como una levadura o un hongo filamentoso.

Tales productos de fermentación pueden ser, por ejemplo, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama o una cefalosporina. Una célula huésped modificada preferida de la invención para la producción de productos de fermentación no etanólicos es una célula huésped que contiene una modificación genética que da como resultado una actividad de alcohol deshidrogenasa disminuida.

En un aspecto adicional la invención se relaciona con procesos de fermentación en los cuales las células huésped

modificadas de la invención se utilizan para la fermentación de una fuente de carbono que comprende una fuente de xilosa, tal como xilosa. Además de una fuente de xilosa la fuente de carbono en el medio de fermentación también pueden comprender una fuente de glucosa. La fuente de xilosa o glucosa puede ser xilosa o glucosa como tales o puede ser cualquier carbohidrato oligo o polimérico que comprende unidades de xilosa o glucosa, tal como, por ejemplo, linocelulosa, xilanos, celulosa, almidón y similares. Para la liberación de unidades de xilosa o glucosa a partir de tales carbohidratos, pueden añadirse carbohidrasas adecuadas (tales como xilanasas, glucanasas, amilasas y similares) al medio de fermentación o pueden ser producidos por la célula huésped modificada. En este último caso la célula huésped modificada puede ser manipulada genéticamente para producir y excretar tales carbohidrasas. Una ventaja adicional del uso de fuentes oligo o poliméricas de glucosa es que permite mantener una concentración baja (más baja) de glucosa libre durante la fermentación, por ejemplo, utilizando cantidades que limitan la tasa de las carbohidrasas. Así, a su vez, se prevendrá la represión de sistemas requerida para el metabolismo y transporte de azúcares diferentes a la glucosa tales como la xilosa.

En un proceso preferido la célula huésped modificada fermenta tanto la xilosa como la glucosa, preferiblemente en forma simultánea en cuyo caso preferiblemente se utiliza una célula huésped modificada que sea insensible a la represión de la glucosa para prevenir el crecimiento diauxico. Además de una fuente de xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá adicionalmente el ingrediente apropiado requerido para el crecimiento de la célula huésped modificada. Las composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras son bien conocidas en la técnica. El proceso de fermentación es un proceso para la producción de un producto de fermentación tal como por ejemplo etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido itacónico y un aminoácido, 1,3-propanodiol etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama, tal como penicilina G o penicilina V y derivados de fermentación de los mismos, y una cefalosporina.

El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aeróbico o anaeróbico. Un proceso de fermentación anaeróbico se define aquí como un proceso de fermentación llevado a cabo en la ausencia de oxígeno o en el cual sustancialmente no se consume oxígeno, preferiblemente menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2.5 o aproximadamente 1 mmol/L/h, más preferiblemente se consume 0 mmol/L/h (esto es el consumo de oxígeno no es detectable), y donde las moléculas orgánicas sirven tanto como donores de electrones como aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, la NADH producida en la glicolisis y formación de biomasa, no puede ser oxidada por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como aceptor de electrones e hidrógeno regenerándose por lo tanto NAD^+.

Así, en un proceso de fermentación anaeróbico preferido se utiliza piruvato como aceptador de electrones (y de hidrógeno) y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, y un aminoácido, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama, y una cefalosporina.

El proceso de fermentación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura que sea óptima para la célula huésped modificada. Así, para la mayoría de las células huésped de levadura o fúngicas, el proceso de fermentación se lleva a cabo a una temperatura que es menor de aproximadamente 42ºC, preferiblemente menor de aproximadamente 38ºC. Para células huésped de levadura o fúngicas filamentosas, el proceso de fermentación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura que es inferior a aproximadamente 35, aproximadamente 33, aproximadamente 30 o aproximadamente 28ºC y a una temperatura que es superior a aproximadamente 20, aproximadamente 22 o, aproximadamente 25ºC.

Un proceso preferido es un proceso para la producción de etanol, por lo cual el proceso comprende las etapas de: (a) fermentar un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula huésped modificada como se definió más arriba, por lo cual la célula huésped fermenta la xilosa a etanol; y opcionalmente, (b) recuperar el etanol. El medio de fermentación también puede comprender una fuente de glucosa que también es fermentada a etanol. En el proceso la productividad de etanol volumétrica es preferiblemente al menos aproximadamente 0.5, aproximadamente 1.0, aproximadamente 1.5, aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.5, aproximadamente 3.0, aproximadamente 5.0 o aproximadamente 10.0 g de etanol por litro por hora. El rendimiento en etanol sobre xilosa y/o glucosa en el proceso preferiblemente es aproximadamente al menos 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 95 o aproximadamente 98%. El rendimiento en etanol se define aquí como un porcentaje de rendimiento máximo teórico.

La invención también se relaciona con un proceso para producir un producto de fermentación, siendo seleccionado tal producto del grupo consistente de butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama y una cefalosporina. El proceso comprende preferiblemente fermentar un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula huésped modificada como se definió más arriba, mediante lo cual la célula huésped fermenta la xilosa al producto de fermentación.

La invención también provee un proceso para producir un producto de fermentación, tal como un producto seleccionado del grupo consistente de etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propanodiol,

etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama y una cefalosporina. El proceso comprende preferiblemente la fermentación de un medio que contiene al menos una fuente de xilosa y una fuente de L-arabinosa con una célula como se definió más arriba la cual es capaz de utilizar tanto xilosa como L-arabinosa de forma tal que la célula fermenta la xilosa y la L-arabinosa hasta el producto de fermentación.

La invención también proporciona un proceso para producir un producto de fermentación, tal como un producto seleccionado del grupo consistente de etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama y una cefalosporina. El proceso comprende preferiblemente la fermentación de un medio que contiene al menos una fuente de xilosa y una fuente de L-arabinosa con una célula como se definió más arriba y una célula capaz de usar L-arabinosa, mediante el cual cada célula fermenta xilosa y/o arabinosa hasta el producto de fermentación.

Un proceso de la invención puede comprender también la recuperación del producto de fermentación. El medio con el cual el proceso se lleva a cabo también puede contener una fuente de glucosa.

El proceso de acuerdo con la presente invención puede transcurrir bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Preferiblemente, el proceso se lleva a cabo bajo condiciones microaerofílicas o limitadas en oxígeno.

Un proceso de fermentación anaeróbico se define aquí como un proceso de fermentación que transcurre en ausencia de oxígeno o en el cual no se consume sustancialmente oxígeno, preferiblemente menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2.5 o aproximadamente 1 mmol/L/h, y donde las moléculas orgánicas sirven tanto como donores de electrones como aceptores de electrones.

Un proceso de fermentación limitado en oxígeno es un proceso en el cual el consumo de oxígeno se limita por la transferencia de oxígeno desde el gas hasta el líquido. El grado de limitación del oxígeno se determina por la cantidad y composición del flujo de gas entrante así como las propiedades de mezclado/transferencia de masa reales del equipo de fermentación usado. Preferiblemente, en un proceso bajo condiciones limitadas en oxígeno, la tasa de consumo de oxígeno es al menos aproximadamente de 5.5, más preferiblemente al menos 6, tal como al menos 7 mmol/L/h.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplos

Técnicas de biología molecular general

A menos que se indique otra cosa, los métodos utilizados son técnicas bioquímicas estándar. Ejemplos de libros de texto de metodología general adecuados incluyen Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989) y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

Se realizaron experimentos de crecimiento usando medio Verduyn (Verduyn, 1992) o medio YEPh (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de fitona), enriquecido con azúcares como se indica en los ejemplos. Para medio YEPh sólido, se añadieron 20 g/l de agar al medio líquido previamente a la esterilización.

Transformación de células de levadura con ADN circular

Se realizó transformación de levaduras según el método descrito en Chen et al., (Current genetics (1992), Volumen 21, número 1, 83-84) en el caso de ADN de plásmido.

Transformación de células de levadura con fragmentos de ADN lineales por electroporación.

Se cultivaron células de levadura por inoculación de 25 ml de medio YEPh que contenía 2% de glucosa con una única colonia de levaduras. Se incubó el matraz durante la noche a 30ºC, 29 rad/s (280 rpm).

Se determinó la densidad óptica a 600 nm y se transformó la cantidad necesaria para obtener una densidad óptica de 0.2 en 100 ml de medio YEPh con 2% de glucosa. Se cultivaron las células durante 4 a 5 horas a 30 °C, 29 rad/s (280 rpm), para alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 1.2 a 1.3, que corresponde a 2 a 3 generaciones. Se recogieron las células por centrifugación y volvieron a suspenderse en 28 ml de TE (Tris.HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 7.5). Se añadieron 3 ml de una disolución de LiAC 1 M (fijada a pH 7.5 con HAc diluido). Se agitaron suavemente las células en una incubadora rotatoria (16 rad/s (150 rpm)), 30 °C) durante 45 minutos. Después de adición de 500 µl de una disolución de DTT 1 M (ditiotreitol), se incubaron las células una vez en estas condiciones, durante 15 minutos. Se completó el volumen a 100 ml con agua milli-Q, enfriada con hielo, estéril. Se recogieron las células por centrifugación.

Se desechó el sobrenadante y se lavaron las células del botón con 50 ml de agua milli-Q, enfriada con hielo, estéril y se recogieron por centrifugación. Se realizó un tratamiento de lavado posterior con 30 ml de una disolución de sorbitol 1 M enfriada en hielo. Después de centrifugación, se desechó el sobrenadante y se volvieron a suspender el botón de células en 4 ml de una disolución de sorbitol 1 M enfriada en hielo. Después de centrifugación, se desechó

el sobrenadante y se volvió a suspender el botón de células en 300 µl de una disolución de sorbitol 1 M enfriada en hielo.

Para cada transformación, se transfirieron 40 µl de la suspensión de células a tubos Eppendorf enfriados en hielo. Se añadió el ADN transformador y 5 µg de ADN de esperma de salmón (como ADN portador) en un volumen máximo de 20 µl. El ADN debería disolverse en TE. Se tapó cuidadosamente el tubo Eppendorf para mezclar el contenido cuidadosamente. Con posterioridad, se transfirió el contenido a una cubeta de electroporación preenfriada (en hielo) con una abertura de 0.2 cm y un pulso (usando, por ejemplo, un dispositivo de electroporación BioRad) a 1.5 kV, 200 Ω y 25 µF. El tiempo de pulso debería ser de alrededor de 5 ms.

Se transfirieron las células inmediatamente a 200 µl de sorbitol 1 M. Con posterioridad, se añadieron 4 ml de YEPh con 2% de glucosa y se incubó la suspensión de células a 30 °C durante 1 hora. Después de esta hora, se recogieron las células por centrifugación, se desechó el sobrenadante y volvió a suspenderse el botón en 4 ml de sorbitol 1 M. Se recogieron de nuevo las células por centrifugación, se desechó el sobrenadante y se volvió a suspender el gránulo en 300 µl de sorbitol 1 M. Se diluyeron las células cuando fue apropiado y se usaron en medio selectivo.

Producción de etanol

Se prepararon precultivos por inoculación de 25 ml de medio Verduyn (Verduyn et al., Yeast 8:501-517, 1992), enriquecido con glucosa al 2 % en un frasco agitador de 100 ml con un cultivo de reserva congelado o una única colonia de una placa de agar. Después de incubación a 30 °C en un agitador orbital (29 rad/s (280 rpm)) durante aproximadamente 24 horas, se recogió este cultivo y se usó para la determinación del desprendimiento de dióxido de carbono y experimentos de producción de etanol.

Se realizaron cultivos para producción de etanol a 30 °C en 100 ml de medio modelo sintético (medio Verduyn (Verduyn et al., Yeast 8:501-517, 1992) con 5% de glucosa, 5% de xilosa, 3.5 % de arabinosa, 1% de galactosa y 0.5% de manosa) en el MAB (Monitor de Actividad Biológica, Halotec, Países Bajos). El pH del medio se ajustó a 4.2 con NaOH 2 M/H_2SO_4 previamente a la esterilización. Se complementó el medio sintético para cultivo anaeróbico con 0.01 g/l de ergosterol y 0.42 g/l de Tween 80 disueltos en etanol (Andreasen y Stier. J. Cell Physiol. 41:23-36, 1953 y Andreasen y Stier. J. Cell Physiol. 43: 271-281, 1954). Se inoculó el medio a una DO^{600} inicial de aproximadamente 2. Se agitaron los cultivos mediante un agitador magnético. Se desarrollaron rápidamente condiciones anaeróbicas durante la fermentación a medida que los cultivos no estaban aireados. Se controló constantemente la producción de dióxido de carbono. Se analizó la conversión de azúcar y la formación de producto (etanol, glicerol) por RMN. Se controló el crecimiento siguiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro LKB Ultrospec K.

Ejemplo 1

Construcción del vector de expresión de xilosa isomerasa

Se designó un gen xylA de par de codones optimizados, sintético, basándose en la secuencia de aminoácidos primaria y se sintetizó por GeneArt (Regensburg, Alemania). Se realizó la optimización del par de codones como se describió previamente (patente internacional WO 2008000632). La secuencia de nucleótidos está incluida en la presente como SEC. ID NO: 1, la correspondiente secuencia de aminoácidos como SEC. ID NO: 2.

Se clonó el marco de lectura abierto en el vector de lanzadera de la levadura p427-TEF (figura 1; DualSystems Biotech., Schlieren, Suiza) usando las enzimas de restricción SpeI y XmaI.

El plásmido se denominó pPWT215.

Ejemplo 2

Transformación de BIE104P1 con pPWT215

Una cepa *S. cerevisiae* BIE104P1 (MATa URA3 HIS3 LEU2 TRP1 MAL2-8 SUC2 GRE3::[TPI1p-TAL1_ADH1p-TKL1_PGI1p-RPE1_ENO1p-RKI1]) como se describe en la patente internacional WO 2009109633, en la que el gen GRE3 fue reemplazado por los genes de la parte no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato se transformó con el plásmido pPWT215, usando el método de transformación de levaduras en una sola etapa descrito por Chen et al., (1992). Como control negativo se usó Milli-Q. Se volvió a suspender el botón final del procedimiento de transformación en 1 ml de YEPh con glucosa al 2% (véase anteriormente). Se pusieron en placas 50 µl de esta mezcla de transformación en una placa de YEPh-agar enriquecida con glucosa al 2% y 200 µg de G418/ml. Se transfirieron los restantes 950 µl a un frasco agitador de 100 ml que contenía 25 ml de medio Verduyn, enriquecido con xilosa al 2%, 10 µg de G418/ml y 250 µl de una disolución de Pen-Estrep (Gibco/Invitrogen). Se incubaron los matraces inoculados (transformación de control y transformación de plásmido) en un agitador rotatorio a 30ºC y 29 rad/s (280 rpm). Se siguió la densidad óptica con el tiempo.

Ejemplo 3

Experimento de crecimiento

El progreso del experimento de crecimiento después de la transformación se muestra la figura 2.

Durante los primeros diez días del experimento de crecimiento, la densidad óptica a 600 nm de los cultivos apenas aumentó. Después de 20 días (indicado con “1” en la figura 2) la densidad óptica del cultivo celular transformado con plásmido alcanzó un valor mayor que 20. Con posterioridad, se transfirió una cantidad del cultivo a una alícuota fresca de 25 ml de medio Verduyn que contenía xilosa al 2%, 10 µg de G418/ml y 250 µl de Pen-Strep. Como es evidente de la figura 2, se realizaron 4 transferencias. Se realizó el experimento de crecimiento en presencia de aire, excepto para el último cultivo, después de la cuarta transferencia, que se realizó en un frasco agitador con un cierre hidráulico (condiciones anaeróbicas).

A partir de la figura 2, se puede concluir que las células de levadura de la cepa BIE104P1 transformadas con pPWT215 han ganado la capacidad para utilizar xilosa como única fuente de carbono y energía, mientras que las células de levadura de la misma cepa, transformadas mediante control, no mostraron un aumento en la densidad óptica, puesto que no pueden crecer en xilosa.

Ejemplo 4

Construcción de una célula de fermentación de pentosa

La cepa BIE292 de *S. cerevisae* es un derivado de la cepa BIE201. Se ha descrito la construcción de esta cepa en la patente española PCT/EP2011/056242, ejemplo 7. Es el resultado de un retrocruce de la cepa BIE201, una cepa que se optimiza por transformación y evolución adaptativa para la fermentación eficaz de arabinosa, y su precursor, previamente a la evolución adaptativa, a la cepa BIE104A2P1a. La cepa BIE292 expresa los genes araA, araB y araD de *Lactobacillus plantarum* y los genes TAL1, TKL1, RPE1 y RKI1 de la ruta de la pentosa fosfato no oxidativa, de manera constitutiva, y se ha eliminado el gen GRE3 que codifica aldosa reductasa. Además, la BIE292 presenta una multiplicación de este casete de arabinosa en el cromosoma VII y el SNP en el gen GAL80 (cambio de nucleótido A436C, donde la A del codón de inicio ATG es 1).

Con posterioridad, se transformó la cepa BIE292 con fragmentos de la PCR del gen xylA optimizado del par de codones, incluyendo las secuencias promotora y terminadora, flanqueada con regiones de solapamiento de 100 pb en las secuencias Ty1 en el genoma. El casete de expresión de xylA se multiplicó por PCR usando pPWT215 como una plantilla. Se realizó la reacción PCR con las secuencias cebadoras SEC. ID. NO: 3 y SEC. ID. NO: 4 usando ADN polimerasa de Phusion (Finnzymes) usando las instrucciones del suministrador. El casete de expresión multiplicado fue etanol precipitado y almacenado a -20°C previamente a su uso.

El ADN precipitado se recogió por centrifugación y se lavó el botón de ADN con etanol al 70% y posteriormente se secó al aire. Se disolvió el ADN en una concentración de aproximadamente 1 µg de ADN/µl en tampón de TE.

Se cultivó cepa de levadura BIE292 en medio YEPh que contenía glucosa al 2%. Se prepararon células competentes por electroporación, como se describió anteriormente. Las células electrocompetentes fueron transformadas con 20 µg de producto de la PCR. Como control negativo, se usó agua milli-Q.

Se transfirieron directamente mezclas de transformación de la transformación de tanto xylA- como de control a 4 frascos de agitación diferentes conteniendo cada uno 25 ml de medio Verduyn enriquecido con xilosa al 2% y 250 µl de pen/estrep. Como no se usa marcador de selección dominante, no se llevó a cabo selección de transformantes correctos en la placa después de la transformación.

Se incubaron ocho frascos de agitación en un agitador rotatorio a 30 °C y 29 rad/s (280 rpm). Se controló el crecimiento midiendo la densidad óptica a 600 nm, con frecuencia.

Ejemplo 5

Selección y caracterización de una cepa de levadura de fermentación de pentosa

Si el cultivo descrito en el Ejemplo 4 ha alcanzado una densidad óptica a 600 nm mayor que 15, se transfiere una alícuota de 250 µl a un matraz que contiene medio Verduyn enriquecido con xilosa al 2%. Se controla la densidad óptica a 600 nm con frecuencia. La velocidad de crecimiento se determina con el uso de los datos de densidad óptica.

Después de varios ciclos de inoculación en medio que contiene xilosa, se usa medio Verduyn que contiene arabinosa al 2% como fuente de carbono, para mantener la presión selectiva en la utilización de arabinosa. Asimismo, se usa un matraz que contiene medio Verduyn enriquecido con una mezcla de hexosas (es decir, glucosa, galactosa y/o manosa) y pentosas (es decir, arabinosa y/o xilosa). Los experimentos de cultivo se realizan inicialmente en condiciones aeróbicas, pero con posterioridad se realizan en condiciones anaeróbicas, por ejemplo, cuando la velocidad de crecimiento excede de un valor de aproximadamente 0.07 por hora o mayor, en tanto arabinosa como xilosa.

Después de varios ciclos de crecimiento y reinoculación en condiciones anaeróbicas, se diluye una alícuota de los cultivos a aproximadamente 100-1000 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro y se cultivan con posterioridad alícuotas de 10 – 100 µl en placas de YEPh-agar que contienen glucosa al 2%. Se incuban las placas durante al menos 48 horas a 30ºC o hasta que son visibles colonias únicas.

Se ensayan aislados de colonias únicas en el MAB (véase supra). Se seleccionan aislados de colonias únicas sobre la base de la capacidad para fermentar los cinco azúcares con eficacia, como se deduce del perfil del dióxido de carbono y los datos RMN de los azúcares, etanol y subproductos.

Las mejores cepas se caracterizan por técnicas genéticas y de biología molecular conocidas para los expertos en la materia, tales como PCR, prueba(s) de Southern, FIGE y resecuenciación.

Ejemplo 6

Selección y caracterización de una cepa de levadura de fermentación de pentosa

Cuando el cultivo descrito en el Ejemplo 4 hubo alcanzado una densidad óptica a 600 nm mayor que 10, se transfirió un alícuota de 25 µl a un frasco agitador que contenía medio Verduyn enriquecido con xilosa al 2%. Se controló la densidad óptica con frecuencia y se determinó la velocidad de crecimiento con el uso de estos datos. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm mayor que 15, se transfirió una alícuota del cultivo a un frasco agitador que contenía medio Verduyn enriquecido con xilosa al 2% y se cerró el frasco agitador con un cierre hidráulico que permitía el cultivo anaeróbico. Desde este punto, se realizaron incubaciones en un agitador orbital a 30 °C y 10 rad/s (100 rpm). Se controló el crecimiento del cultivo midiendo la densidad óptica a 600 nm y se calculó la tasa de crecimiento basándose en estos datos. Cuando la densidad óptica a 600 nm del cultivo alcanzó un valor mayor que 3.75, se transfirió una alícuota del cultivo a un frasco agitador que contenía medio Verduyn enriquecido con arabinosa al 2%. Se cerró el frasco agitador con un cierre hidráulico. En el caso de que el cultivo alcanzara una densidad óptica a 600 nm con un valor mayor que 5, se transfirió de nuevo una alícuota del cultivo a un frasco agitador que contenía medio Verduyn enriquecido con xilosa al 2 % y se cerró este frasco agitador con un cierre hidráulico. Un resultado típico de este experimento de crecimiento se proporciona en la figura 3.

Como es evidente a partir de la figura 3, la transformación de BIE292 con XylA de *Clostridium beyerinckii* permitió que esta cepa obtuviera rápidamente un fenotipo consumidor de xilosa, al tiempo que la transformación de control no daba como resultado células consumidoras de xilosa.

La tabla 1 presenta las tasas de crecimiento de cepas *S. cerevisiae* transformadas con genes de xilosa isomerasa de varios organismos. La cepa BIE292XI (*C. beyerinckii*) demostró la tasa de crecimiento más alta en condiciones aeróbicas en el crecimiento inicial en xilosa como única fuente de carbono después de la transformación. Además, BIE292XI (*C. beyerinckii*) fue la única cepa capaz de crecer en xilosa en condiciones anaeróbicas sin ingeniería evolutiva exhaustiva.

Tabla 1: Tasas de crecimiento de BIE292XI (C. *beyerinckii)* y datos disponibles al público de cepas *Saccharomyces cerevisiae* transformadas con XI de *Clostridium phytofermentans* (ref. 1), *Orpinomyces* (ref. 2), *Piromyces* (RWB202) (ref. 3) y *Thermus thermophilus* (ref. 4), en el crecimiento inicial en xilosa.

Xilosa isomerasa	Aeróbico	Anaeróbico
C. beyerincki	0.061 h^{-1}	0.056 h^{-1}
C. phytofermentans	0.039 h^{-1}	--
Orpinomyces	0.01 h^{-1}	--
Piromyces	0.005 h^{-1}	--
T. thermophilus	--	--

Los datos presentados en la tabla anterior están obtenidos todos a partir de diferentes antecedentes de cepas.

- indica no medido o no ensayado. Para la cepa de S. *cerevisiae* que alberga XI de *T. Thermophilus* se indica que no se observó consumo de xilosa, pero los niveles de consumo fueron demasiado bajos para soportar crecimiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> UNA CÉLULA FERMENTADORA DE AZÚCAR PENTOSA

<130> 28261-WO-PCT

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1374

<212> ADN

<213> ADN sintético

<400> 1

actagtaaaa acacatacat aaactaaaaa tgagagaata cttcgaaaac gtttccaaga 60

tcaactacga aggtgctaac tccaagaacc catactcttt caagtactac aacccagatg 120

aaatcattgg tgacaaggct atgaaggaac acttgagatt tgctctatcc tactggcaca 180

ctttaaccgc caccggtgct gatcctttcg gtgttggtac tatgatcaga ccatgggact 240

ctgaaaccaa tgaaatggac ttggccaagg ccagaatgga agctgctttc gaattgatgg 300

acaaattgaa catcgaatac ttctgtttcc acgaccgtga cattgcccca gaaggtaaga 360

ctttgcaaga aaccaacaag aacttggatg aaattgttgc tctatgtaag tctttgatga 420

agaagtacaa caagaaattg ttgtggggta ctgctaactg tttcaccaac ccacgttacg 480

ttcacggtgc tggtacttcc tgtaacgctg atgttttcgc ttatgctgct gctcaaatca 540

agaaggccat cgaaatcacc aaggaattgg atggtgaaaa ctacgtcttt tggggtggta 600

gagaaggtta cgaaacttta ttgaacactg acatgggttt ggaattggac aactttgcta 660

gattattgca aatggctgtc gactacgcca aggaaattgg tttcaccggt caattcttga 720

ttgaaccaaa gccaaaggaa ccaaccaagc accaatacga tttcgatgct gctaccgttt 780

tgggtttctt gaagaactac aacttggaca aatacttcaa ggttaacatt gaagctaacc 840

atgccacttt agctcaacac actttccaac acgaattgca cttcgccaga atcaacaaat 900

tcttgggttc tattgacgct aaccaaggtg acccattatt gggttgggac actgaccaat 960

tcccaaccaa catctacgat gctactttgg ctatgtacga aatcttgaaa aatggtggtt 1020

tggctccagg tggtgtcaac ttcgactcca aggtcagaag agcttctttc gaaaaggaag 1080

atttgttctt ggcttacatt gctggtatgg acacctttgc caagggtttg agagttgctt 1140

acaagttgtt ggaaaacggt gacttggaag atttcatcaa ggaaaaatac tcttctttca 1200

ccgaaggtat tggtaaggaa atcgtcgaag gtaaggtcgg tttcaaggaa ttggaagcct 1260

acgctttgaa caacaaccca atcatcaaca agtctggtag acaagaatta ttggaatcca 1320

ttgtcaacca atacatcttc gaagatcaca aataagccgc ggtcgcgacc cggg 1374

<210> 2
<211> 441
<212> PRT
<213> xilosa isomerasa Clostridium beijerinckii NCIMB 8052
<400> 2

```
Met Arg Glu Tyr Phe Glu Asn Val Ser Lys Ile Asn Tyr Glu Gly Ala
1               5                  10                  15

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

Ile Gly Asp Lys Ala Met Lys Glu His Leu Arg Phe Ala Leu Ser Tyr
        35                  40                  45

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

Met Ile Arg Pro Trp Asp Ser Glu Thr Asn Glu Met Asp Leu Ala Lys
65                  70                  75                  80

Ala Arg Met Glu Ala Ala Phe Glu Leu Met Asp Lys Leu Asn Ile Glu
                85                  90                  95

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

Gln Glu Thr Asn Lys Asn Leu Asp Glu Ile Val Ala Leu Cys Lys Ser
        115                 120                 125

Leu Met Lys Lys Tyr Asn Lys Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala Asn Cys
    130                 135                 140

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

Asp Val Phe Ala Tyr Ala Ala Ala Gln Ile Lys Lys Ala Ile Glu Ile
                165                 170                 175

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

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

Phe Ala Arg Leu Leu Gln Met Ala Val Asp Tyr Ala Lys Glu Ile Gly
    210                 215                 220

Phe Thr Gly Gln Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Lys Glu Pro Thr Lys
225                 230                 235                 240
```

```
His Gln Tyr Asp Phe Asp Ala Ala Thr Val Leu Gly Phe Leu Lys Asn
                245                 250                 255

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

Thr Leu Ala Gln His Thr Phe Gln His Glu Leu His Phe Ala Arg Ile
        275                 280                 285

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

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

Ala Met Tyr Glu Ile Leu Lys Asn Gly Gly Leu Ala Pro Gly Gly Val
                325                 330                 335

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

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

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

Glu Lys Tyr Ser Ser Phe Thr Glu Gly Ile Gly Lys Glu Ile Val Glu
385                 390                 395                 400

Gly Lys Val Gly Phe Lys Glu Leu Glu Ala Tyr Ala Leu Asn Asn Asn
                405                 410                 415

Pro Ile Ile Asn Lys Ser Gly Arg Gln Glu Leu Leu Glu Ser Ile Val
            420                 425                 430

Asn Gln Tyr Ile Phe Glu Asp His Lys
        435                 440
```

<210> 3
<211> 123
<212> ADN
<213> ADN sintético
<400> 3

tttctcatgg tagcgcctgt gcttcggtta cttctaagga agtccacaca aatcaagatc 60

cgttagacgt ttcagcttcc aaaacagaag aatgtgagac caaaagctgg agctcatagc 120

ttc 123

<210> 4
<211> 121
<212> ADN
<213> ADN sintético
<400> 4

tggaggtggt actgaagcag gttgaggaga ggcatgatgg gggttctctg gaacagctga 60

tgaagcaggt gttgttgtct gttgagagtt agccttagtg gtaccggccg caaattaaag 120

c 121

REIVINDICACIONES

1. Una célula que es capaz de fermentación y de uso de xilosa como fuente de carbono, célula que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa, donde la secuencia de aminoácidos de la xilosa isomerasa tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO 2 y donde la secuencia de nucleótidos es heteróloga al huésped.

2. Una célula de acuerdo a la reivindicación 1 la cual es una célula de levadura.

3. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa es obtenible a partir de la célula del género *Clostridium*.

4. Una célula de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 la cual es una célula de levadura del género *Saccharomyce, Kluyveromyces, Cándida, Pichia, Schizosaccharomyces, Hansenula, Klockera, Schwanniomyces o Yarrowia*.

5. Una célula de acuerdo con la reivindicación 4, donde la célula de levadura es de la especie *S. cerevisiae, S. bulderi, S barnetti, S.exiguus, S.uvarum, S.diastaticus, K. lactis, K. marxianus o K. fragilis*.

6. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula comprende una o más modificaciones genéticas que dan como resultado:

a. un incremento en el transporte de xilosa en la célula;

b. un incremento en la actividad de xilulosa quinasa;

c. un incremento en el flujo a través de la ruta del fosfato de pentosa;

d. una disminución en la actividad de la aldosa reductasa;

e. una disminución en la sensibilidad a la represión de catabolitos;

f. un incremento en la tolerancia al etanol, osmolaridad o ácidos orgánicos; o

g. una producción reducida de subproductos.

7. Una célula de acuerdo con la reivindicación 6, donde la una o más modificaciones genéticas dan como resultado la sobreexpresión de al menos un gen que codifica una enzima de la parte no oxidativa de la ruta del fosfato de pentosa.

8. Una célula de acuerdo con la reivindicación 7, donde el gen es un gen que codifica una ribulosa-5-fosfato isomerasa, una ribulosa-5-fosfato epimerasa, una transcetolasa o una transaldolasa.

9. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la una o más modificaciones genéticas dan como resultado la sobreexpresión de un gen que codifica una xilulosa quinasa.

10. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde la una o más modificaciones genéticas dan como resultado un descenso en la actividad no especificada en la aldosa reductasa en la célula.

11. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene la capacidad de utilizar L-arabinosa, donde los genes TAL1, TKL1, RPE1 y RKI1 están sobreexpresados.

12. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde la región codificante del gen GRE3 es inactivado por reemplazo de la región codificante con una secuencia de nucleótidos que comprende los genes TAL1, TKL1, RPE1 y RKI1.

13. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, donde los genes araA, araB y araD de *Lactobacillus plantarum* son expresados.

14. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, donde uno o más genes expresados constitutivamente o sobreexpresados constitutivamente están integrados de forma estable en el genoma de la célula.

15. Un proceso para producir un producto de fermentación proceso que comprende fermentar un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes de forma que la célula fermenta la xilosa hasta el producto de fermentación.

16. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 15, donde el producto de fermentación es etanol, butanol,

ácido láctico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, butanol, un antibiótico de β-lactama o una cefalosporina.

17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, donde el proceso es anaeróbico.

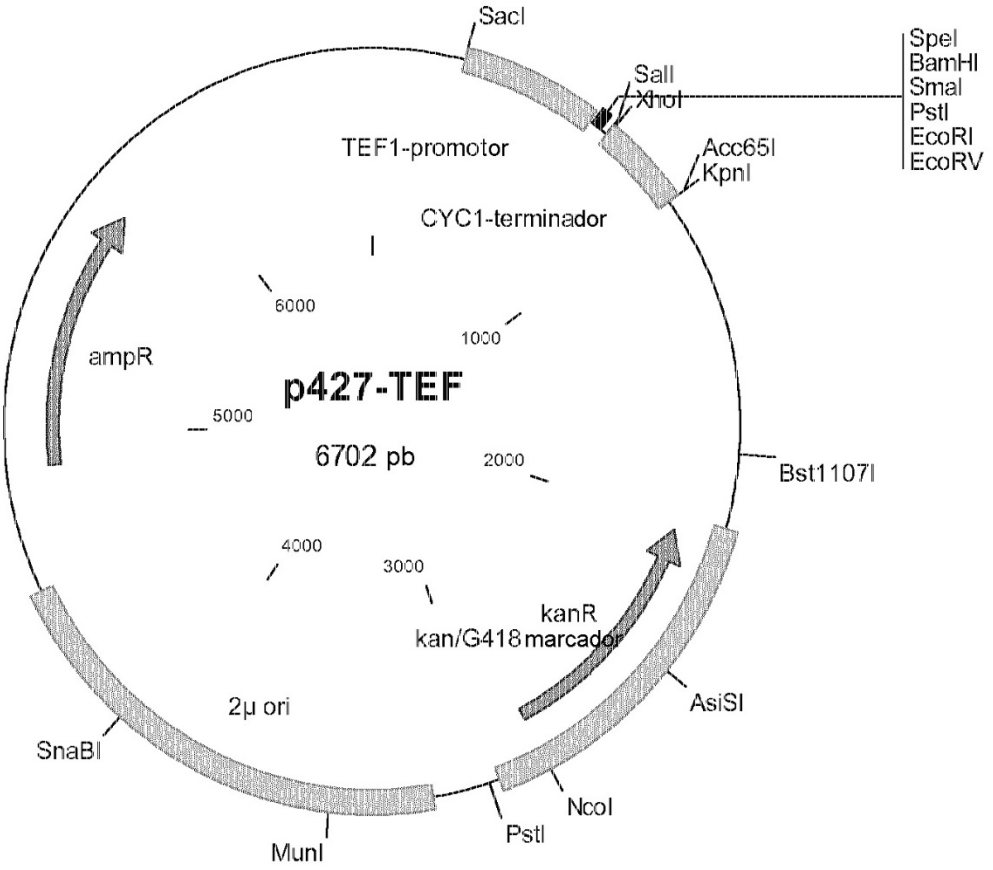
SacI
SpeI
BamHI
SmaI
PstI
EcoRI
EcoRV
SalI
XhoI
Acc65I
KpnI
TEF1-promotor
CYC1-terminador
6000
1000
ampR
p427-TEF
5000
6702 pb
2000
Bst1107I
4000
3000
kanR
kan/G418 marcador
2µ ori
AsiSI
SnaBI
NcoI
PstI
MunI

Fig. 1

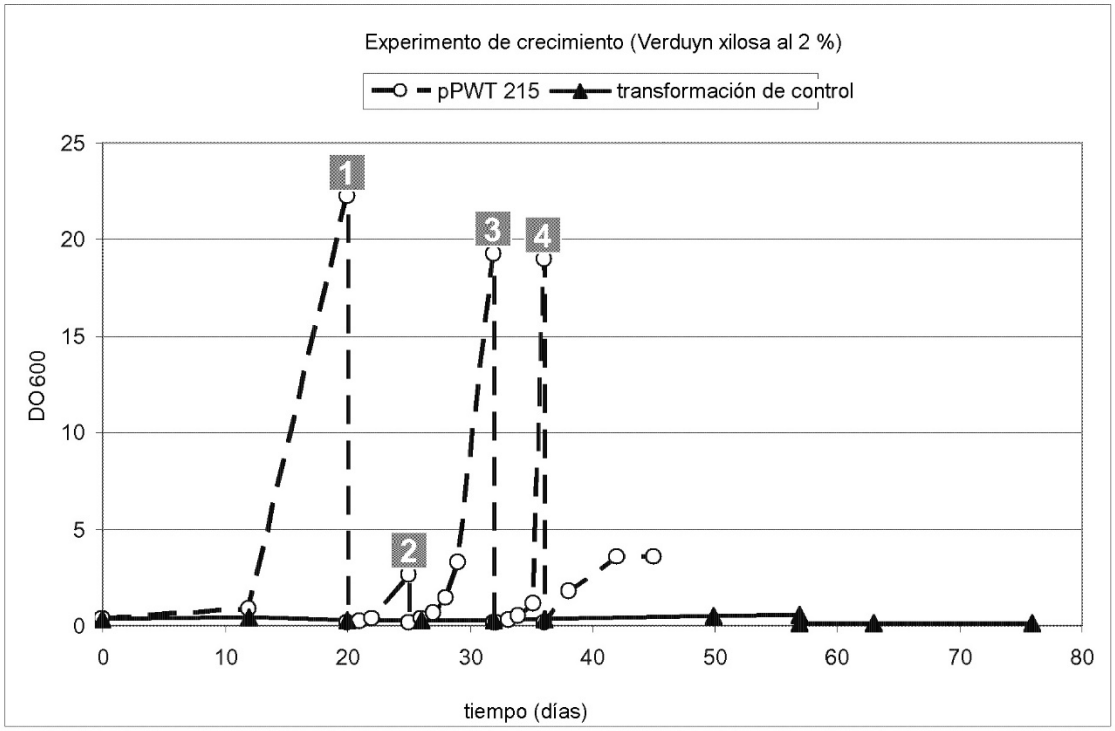
Experimento de crecimiento (Verduyn xilosa al 2 %)
pPWT 215
transformación de control
DO600
tiempo (días)
1
2
3
4
0
5
10
15
20
25
0
10
20
30
40
50
60
70
80

Fig. 2

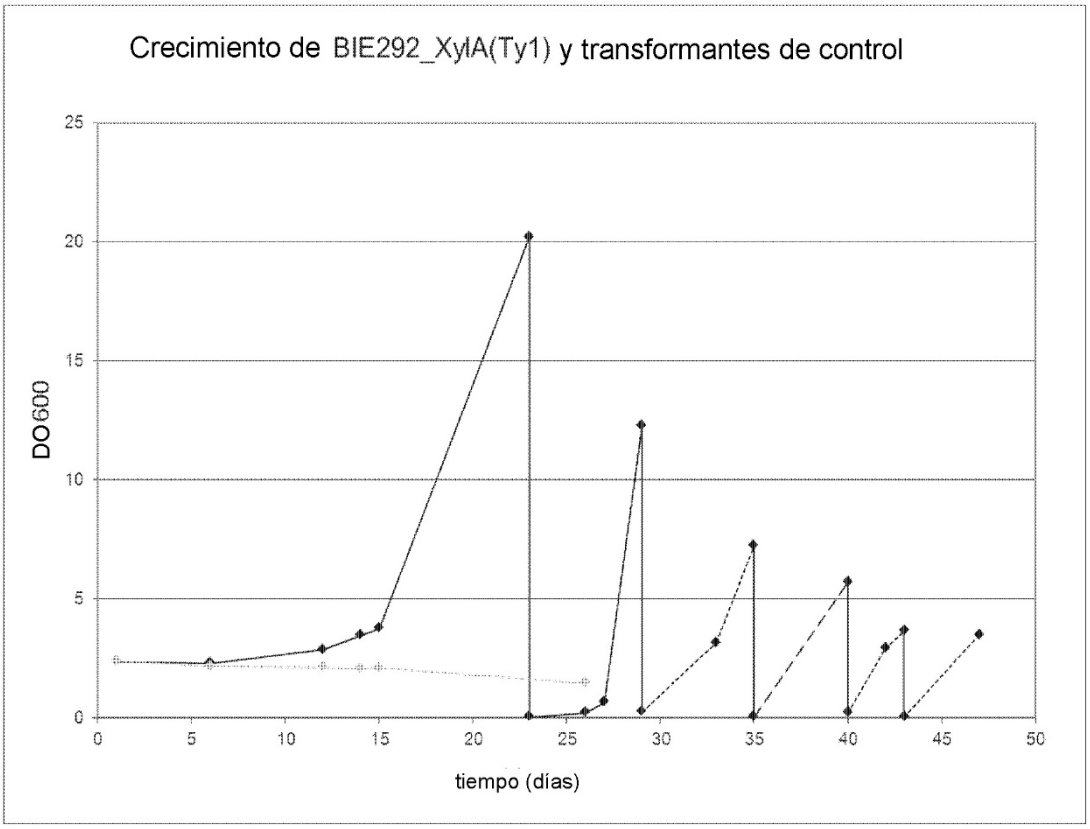
Crecimiento de BIE292_XylA(Ty1) y transformantes de control
DO600
tiempo (días)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

Fig. 3