

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 865**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C13K 13/00 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2014** **E 14305934 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2957640**

54 Título: **Producción de xilitol a partir de glucosa mediante una cepa recombinante**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2018

73 Titular/es:

ROQUETTE FRÈRES (100.0%)
1 rue de la Haute Loge
62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:

DEFRETIN, SOPHIE;
GERARD, TANIA;
HEYSEN, ARNAUD;
SCHAEFER, ASTRID;
DIEFENBACHER, MELANIE;
CHANG, YIMING;
HONDA MALCA, SUMIRE;
SCHWAB, MARKUS y
THOR, FRIEDERIKE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 673 865 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de xilitol a partir de glucosa mediante una cepa recombinante

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para usar microorganismos genéticamente modificados para la producción de xilitol y a un método para preparar un microorganismo genéticamente modificado que es capaz de convertir en una etapa fuentes de carbono fáciles de conseguir, tales como D-glucosa, en xilitol.

Antecedentes de la invención

El xilitol es un polialcohol o alcohol de azúcar (alditol) de fórmula $(\text{CHOH})_3(\text{CH}_2\text{OH})_2$, que se aplica en formulaciones y productos para higiene y nutracéuticos.

- 10 El xilitol se usa como un edulcorante diabético que es casi tan dulce como la sacarosa con 33 % menos de calorías. A diferencia de otros edulcorantes naturales o sintéticos, el xilitol es activamente beneficioso para la salud dental ya que reduce las caries hasta un tercio con su uso regular y ayuda a la remineralización.

- 15 El xilitol se encuentra naturalmente en concentraciones bajas en las fibras de muchos frutos y hortalizas, y se puede extraer de varias bayas, avena y setas, así como de materiales fibrosos como vainas de maíz y bagazo de caña de azúcar, y abedul.

Sin embargo, la producción industrial comienza a partir de xilano (una hemicelulosa) extraído de maderas duras o zuros de maíz, que se hidroliza en xilosa y se hidrogena catalíticamente en xilitol.

La purificación de la xilosa y también del xilitol, por lo tanto, presenta un problema significativo. Se conocen diversos procesos de este tipo. Las patentes estadounidenses 4.075.406 y 4.008.285 se pueden mencionar como ejemplos.

- 20 La reducción de D-xilosa en xilitol también se puede lograr en un proceso microbiológico usando cepas de levadura aisladas a partir de cepas naturales (cepas de tipo natural) o genéticamente manipuladas.

Sin embargo, obtener el sustrato, D-xilosa, en una forma adecuada para la fermentación por levadura es un problema porque las fuentes de xilosa económicas tales como licor de sulfito de procesos de pulpa y papel contienen impurezas que inhiben el crecimiento de la levadura.

- 25 Un método alternativo atractivo para la producción de xilitol es obtenerlo por medio de la fermentación de un sustrato económico y fácil de conseguir, tal como D-glucosa.

En el estado de la técnica, existen algunos microorganismos recombinantes descritos capaces de producir xilitol en ciertas cantidades durante una fermentación de una etapa de cualesquiera fuentes de carbono comunes distintas de D-xilosa y D-xilulosa.

- 30 Estos microorganismos recombinantes, especialmente levaduras osmófilas, son por ejemplo *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida polymorpha* y *Torulopsis candida*, conocidas inicialmente como productoras de cantidades significativas de una xilitol estrechamente relacionado con pentitol, que es D-arabitol, a partir de D-glucosa (Lewis D.H. & Smith D.C., 1967, New Phytol. 66:143-184).

- 35 Por lo tanto, la solicitud de patente internacional WO 94/10325 proporciona métodos para construir dichos hospedantes recombinantes capaces de producir xilitol cuando se cultivan en fuentes de carbono distintas de D-xilulosa o D-xilosa, y distintas de polímeros u oligómeros o mezclas de estos.

En la presente solicitud de patente, este objetivo se logra a través de la modificación del metabolismo del microorganismo deseado, preferiblemente, un microorganismo que es levadura de origen natural, mediante la introducción y expresión de genes heterólogos deseados.

- 40 Este objetivo también se logra mediante la modificación adicional del metabolismo de dicho microorganismo deseado, para sobreexpresar e/o inactivar la actividad o expresión de determinados genes homólogos de dicho microorganismo en su estado natural.

- 45 El método proporcionado en la presente solicitud de patente para la producción de xilitol utilizó una vía de biosíntesis de D-arabitol alterada, y dicha vía se alteró notablemente al extender la vía de D-arabitol preexistente mediante la introducción y sobreexpresión de los genes que codifican D-arabitol deshidrogenasa formadora de D-xilulosa (EC 1.1.1.11) y xilitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.9) en un microorganismo productor de D-arabitol.

Sin embargo, el rendimiento de xilitol en los ensayos descritos en WO 94/10325 fue de solo aproximadamente 7,7 g/l después de 48 horas de cultivo en un medio con extracto de levadura.

- 50 Para intentar optimizar este primer resultado, se propuso adicionalmente en WO 94/10325 inactivar, usando mutagénesis o interrupción génica, los genes que codifican transcetolasa (EC 2.2.1.1) y/o el gen que codifica D-

xilulocinasa (EC 2.7.1.17), y también sobreexpresar los genes que codifican las enzimas de la rama oxidativa de la vía de pentosa-fosfato y, específicamente, el gen de D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) y/o 6-fosfo-D-gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) y/o D-ribulosa-5-fosfato epimerasa (EC 5.1.3.1) en dichos microorganismos.

5 Pero, independientemente de la combinación genética empleada, el título de xilitol nunca superó los 9 g/l.

Lafayette et al (2005, Plant Cell Report, 24, 596-602) describe una construcción génica que codifica Arabitol deshidrogenasa a partir de *E. coli*.

10 El documento US 2011/027847 describe un gen para la xilitol deshidrogenasa específica para NADP aislado a partir de *Pischia stipitis*, una levadura genéticamente modificada a la cual se transfirió un gen de xilosa reductasa, un gen de xilitol deshidrogenasa específico para NADP y xilulocinasa.

Por consiguiente, todavía existe una necesidad insatisfecha de una mejor manipulación genética de las cepas productoras de xilitol a efectos de optimizar su producción y, por lo tanto, hacerla comercialmente rentable.

Compendio de la invención

15 La presente invención se refiere a una célula hospedante recombinante capaz de producir xilitol, en donde dicha célula hospedante comprende:

una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) usando D-arabitol como sustrato y que produce D-xilulosa como producto; y,

una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica una xilitol deshidrogenasa específica para NADPH que usa D-xilulosa como sustrato y que produce xilitol como producto.

20 Preferiblemente, la célula hospedante no consume D-arabitol como única fuente de carbono. Más preferiblemente, la célula hospedante se selecciona de bacterias, hongos y levadura. En una realización preferida, la célula hospedante es una levadura osmófila u osmotolerante, en particular, *Pichia ohmeri*.

25 Preferiblemente, la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) es de *E. coli*. Más preferiblemente, la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) comprende o consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident. 2 o una secuencia con 1-3 adiciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos. En una realización preferida, la secuencia que codifica la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) comprende o consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident. 3.

30 Preferiblemente, la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH es una xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis* o *Gluconobacter oxydans* mutada para cambiar la especificidad para el cofactor de NADH a NADPH. Más preferiblemente, la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH comprende o consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident. 5 u 8 o una secuencia con 1-3 adiciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos. En una realización preferida, la secuencia que codifica la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH comprende o consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident. 6 o 9.

35 Preferiblemente, la célula hospedante es capaz de producir un título de xilitol de al menos 15 g/l en el sobrenadante después de un cultivo de 48 horas.

La presente invención también se refiere a un método para producir xilitol que comprende cultivar una célula hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, y recuperar xilitol.

40 Además, la presente solicitud describe un ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident. 1, 3, 7 y 9, un casete de expresión o vector que comprende dicho ácido nucleico.

Finalmente, la presente invención se refiere al uso de una célula hospedante recombinante según la presente invención para producir xilitol.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

45 Según se usa en la presente memoria, se entiende por "fuente de carbono distinta de D-xilosa y D-xilulosa" un sustrato de carbono para la producción de xilitol distinto de D-xilosa y D-xilulosa o polímeros u oligómeros o mezclas de estos (tales como xilano y hemicelulosa). La fuente de carbono incluye, preferiblemente, D-glucosa, y diversos jarabes que contienen D-glucosa y mezclas de D-glucosa con otros azúcares.

50 Según se usa en la presente memoria, se entiende por "gen" una secuencia de ácido nucleico que puede codificar una proteína, en particular, una secuencia de ADN.

Según se usa en la presente memoria, se entiende por “vector” un plásmido o cualquier otra secuencia de ADN que es capaz de llevar información genética, específicamente ADN, a una célula hospedante. El vector puede contener, además, un marcador o reportero adecuado para su uso en la identificación de células transformadas con el vector, y orígenes de replicación que permiten el mantenimiento y la replicación del vector en uno o más hospedantes procarióticos o eucarióticos. Un “plásmido” es un vector, generalmente ADN circular, que se mantiene y replica de manera autónoma en al menos una célula hospedante.

Según se usa en la presente memoria, se entiende por “vector de expresión” un vector similar a un vector, pero que respalda la expresión de un gen o ácido nucleico codificante que se ha clonado en este, después de la transformación en un hospedante. El gen o ácido nucleico codificante clonado generalmente se coloca bajo el control de (es decir, ligado funcionalmente a) determinadas secuencias de control tales como secuencias promotoras, que se pueden proporcionar mediante el vector o mediante la construcción recombinante del gen clonado. Las secuencias de control de la expresión variarán dependiendo de si el vector se diseña para expresar el gen ligado funcionalmente en un hospedante procariótico o eucariótico y pueden contener, adicionalmente, elementos transcripcionales tales como elementos potenciadores (secuencias de activación posteriores) y secuencias de terminación y/o sitios de iniciación y terminación de la traducción.

Según se usa en la presente memoria, se entiende por “hospedante” una célula, procariótica o eucariótica, que se utiliza como el receptor y vehículo de material recombinante.

Según se usa en la presente memoria, se entiende por “rama oxidativa de la vía de pentosa-fosfato” que se incluye la parte de la derivación de pentosa-fosfato que cataliza reacciones oxidativas, tales como reacciones catalizadas por D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) gluconolactonasa (EC 3.1.1.17), y 6-fosfo-D-gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) y que utiliza sustratos de hexosa para formar pentosa fosfatos. La parte “no oxidativa” de la vía de pentosa-fosfato (que también cataliza la formación neta de ribosa a partir de D-glucosa) se caracteriza por isomerizaciones no oxidativas tales como las reacciones catalizadas por transcetolasa (EC 2.2.1.1), ribosa-5-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.6), D-ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa (EC 5.1.3.1) y transaldolasa (EC 2.2.1.2). Véase Biological Chemistry, H.R. Mahler & E.H. Cordes, Harper & Row, publishers, Nueva York, 1966, págs. 448-454.

Según se usa en la presente memoria, se entiende por “ácido nucleico codificante” una molécula de ácido nucleico (preferiblemente ADN). El ácido nucleico codificante es capaz de codificar una proteína y se puede preparar a partir de una variedad de fuentes. Estas fuentes incluyen ADN genómico, ADNc, ADN sintético y combinaciones de estos.

“Heterólogo/a”, según se usa en la presente memoria, significa que un gen o secuencia codificante se ha introducido en la célula mediante manipulación genética. Puede estar presente en forma episómica o cromosómica. El gen o secuencia codificante puede originarse a partir de una fuente diferente de la célula hospedante en la cual se introduce. Sin embargo, también puede venir de la misma especie que la célula hospedante en la cual se introduce, pero se considera heterólogo debido a que su entorno no es natural. Por ejemplo, se llama heterólogo al gen o secuencia codificante debido a que está bajo el control de un promotor que no es su promotor natural, se introduce en una ubicación que difiere de su ubicación natural. La célula hospedante puede contener una copia endógena del gen antes de la introducción del gen heterólogo o puede no contener una copia endógena.

Objeto de la invención

Según la invención, las vías metabólicas naturales de un hospedante microbiano específico se manipulan para reducir o eliminar la utilización de carbono para propósitos distintos de la producción de xilitol.

Dicha cepa hospedante genéticamente modificada, por lo tanto, es capaz de producir xilitol en una etapa de fermentación con un rendimiento elevado. Por ejemplo, el título de xilitol después 48 horas de cultivo en el sobrenadante es mayor que 15 g/l.

En la puesta en práctica de la invención, el hospedante genéticamente modificado de la invención también se caracteriza por su capacidad para sintetizar xilitol a partir de fuentes de carbono no relacionadas estructuralmente tales como D-glucosa, y no solo a partir de D-xilosa y/o D-xilulosa.

Preferiblemente, el hospedante genéticamente modificado de la invención también es capaz de secretar el xilitol sintetizado en el medio.

Específicamente, en las realizaciones ejemplificadas y preferidas, el hospedante genéticamente modificado de la invención se caracteriza por una vía en la que arabitol es un intermediario en la formación de xilitol.

Por consiguiente, la cepa hospedante recombinante de la invención se caracteriza por las siguientes alteraciones genéticas:

(1) un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína que posee actividad de D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ (formadora de D-xilulosa) se ha introducido en la célula hospedante, proporcionando, de esta manera, la conversión de D-arabitol en D-xilulosa; y

(2) un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína que posee actividad de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH se ha introducido en la célula hospedante, proporcionando, de esta manera, la conversión de D-xilulosa en xilitol.

La elección de los microorganismos

- 5 Los microorganismos o cepas hospedantes adecuados para la presente invención son capaces de producir D-arabitol a partir de glucosa. Más específicamente, son capaces de producir cantidades significativas de D-arabitol a partir de glucosa en medio a presión osmótica elevada.

Se entiende por "medio a presión osmótica elevada", en la presente, un medio que contiene 10-60 % de D-glucosa, preferiblemente, aproximadamente 25 % de D-glucosa.

- 10 Se entiende por "cantidades significativas de D-arabitol" al menos 100 g/L de D-arabitol. En particular, se considera que un microorganismo o cepa hospedante produce cantidades significativas de D-arabitol cuando el microorganismo o cepa hospedante produce 100g/L de D-arabitol en un medio que contiene 25 % de D-glucosa en condiciones de lote.

- 15 Los ejemplos de cepas hospedantes capaces de producir cantidades significativas de D-arabitol a partir de glucosa incluyen levaduras osmófilas u osmotolerantes, en particular, aquellas que pertenecen a las especies *Pichia*, *Kodamaea*, *Candida*, *Zygoaccharomyces*, *Debaromyces*, *Metschnikowia* y *Hansenula*; o los hongos productores de D-arabitol, en particular, aquellos que pertenecen a las especies *Dendryphiella* y *Schizophyllum*, en particular, *Dendryphiella salina* y *Schizophyllum commune*.

- 20 Los ejemplos de los microorganismos del género *Pichia* incluyen *Pichia ohmeri*, *Pichia stipitis*, *Pichia farinosa*, *Pichia haplophila*. Los ejemplos de los microorganismos del género *Candida* incluyen *Candida polymorpha* y *Candida tropicalis*. Los ejemplos de los microorganismos del género *Zygoaccharomyces* incluyen *Zygoaccharomyces rouxii*. Otros ejemplos incluyen *Torulopsis candida* y *Torulaspora hansenii*. Los ejemplos de los microorganismos del género *Metschnikowia* incluyen *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia reukaufii*, *Metschnikowia bicuspidata*, *Metschnikowia lunata* y *Metschnikowia zobellii*. Como cepas específicas, se pueden mencionar *Metschnikowia pulcherrima* ATCC 18406, *Metschnikowia reukaufii* ATCC 18407, *Metschnikowia bicuspidata* ATCC 24179, *Metschnikowia lunata* ATCC 22033, *Metschnikowia zobellii* ATCC 22302 y *Metschnikowia pulcherrima* FERM BP-7161. Estas cepas se pueden obtener en la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo, dirección: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos de América. *Metschnikowia pulcherrima* FERN BP-7161 se depositó originalmente en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, Ministerio de Comercio Internacional e Industria (código postal: 305-8566, 1-3 Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón) el 16 de enero de 1998, con el número de depósito FERM P-16592 y se transfirió del depósito original al depósito internacional en virtud del Tratado de Budapest el 15 de mayo de 2000, y se ha depositado con el número de depósito FERM BP-7161. En un aspecto específico, el microorganismo tiene el número de acceso FERM BP-7161. Por más información, consulte EP1065276.

- 35 El microorganismo se puede manipular genéticamente a efectos de mejorar su capacidad de producir D-arabitol y/o reducir su capacidad de usar D-arabitol para un objetivo distinto de la producción de xilitol.

Para la invención, la cepa hospedante se elige ventajosamente por sus atributos metabólicos específicos:

- 40 – puede ser una productora de cantidades significativas de D-arabitol a partir de glucosa, según se detalla anteriormente, en particular, en medio a presión osmótica elevada, por ejemplo, medio que contiene 10-60 % de D-glucosa y, preferiblemente, 25 % de D-glucosa (el medio "Normal" habitualmente contiene solo 2-3 % de glucosa);
- puede no consumir D-arabitol como única fuente de carbono;
- su equilibrio de oxidorreducción permite la generación de los cofactores necesarios para la conversión de alcohol cetopentosa / pentosa correspondiente.

- 45 En una realización de la invención, la levadura osmófila *Pichia ohmeri* (y sus derivados mutagenizados) se ha empleado como modelo y como hospedante preferido. *Pichia ohmeri* se ha aislado inicialmente a partir de encurtido de pepino y usado comúnmente en la industria alimentaria para la fermentación en conservas, cáscaras y frutos.

- 50 El experto en la técnica sabe que las especies de levaduras tales como *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Debaromyces* y *Hansenula* son capaces de crecer en entornos con baja actividad de agua, a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras osmotolerantes u osmófilas acumulan soluto compatible similar a glicerol, D-arabitol, eritritol y manitol que protegen y estabilizan las enzimas, permitiendo, de esta manera, las funciones celulares en condiciones de crecimiento osmóticas. Los polioles producidos también tienen una función en el equilibrio de la oxidorreducción.

En un aspecto preferido, el microorganismo es *Pichia ohmeri*. De hecho, la principal característica de la cepa hospedante *Pichia ohmeri* es producir solo D-arabitol como soluto compatible, a diferencia de *Zygosaccharomyces rouxii* productora de glicerol y D-arabitol. Además, la vía metabólica de glucosa a D-arabitol se conoce bien en *Pichia ohmeri*.

Según se describió, en *Zygosaccharomyces rouxii* (J.M. INGRAM and W.A. WOOD, 1965, Journal of Bacteriology, tomo 89, n.º 5, 1186-1194), el flujo de carbono en *Pichia ohmeri* pasa a través de la parte oxidativa de la vía de pentosa-fosfato (PPP, por sus siglas en inglés) para convertir D-Glucosa en D-ribulosa-5-P con la producción concomitante de dos moléculas de NADPH. La D-ribulosa-5-P se desfosforila en D-ribulosa y luego se reduce a D-arabitol. En la cepa hospedante *Pichia ohmeri*, la vía de pentosa fosfato (PPP) es muy activa y se ha determinado que supera el 50 %.

Reacciones y enzimas de oxidorreducción

Los cofactores NADH y NADPH son esenciales para múltiples funciones biológicas, actuando en las denominadas reacciones de oxidorreducción como vehículos de electrones de una reacción a otra. Las células necesitan mantener el equilibrio metabólico de los dos pares de oxidorreducción NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ sabiendo que el par NADPH/NADP⁺ se mantiene en un estado más reducido que el par NADH/NAD⁺ para proporcionar una fuerza propulsora termodinámica. NADH, que en su mayoría se encuentra en la forma oxidada NAD⁺, es el principal cofactor en reacciones catabólicas donde participa en la liberación oxidativa de energía de los nutrientes. A diferencia de NADH, NADPH se reoxida exclusivamente en reacciones anabólicas o en momentos de estrés oxidativo.

Cualquier estrategia de manipulación metabólica que implique reacciones de oxidorreducción debe funcionar según estas limitaciones celulares. Esto se ha hecho en la cepa genéticamente modificada que es objeto de la invención.

Según halló la inventora, y se describe notablemente en su tesis de doctorado titulada "Contribution a l'étude du métabolisme des pentitols chez *Pichia ohmeri*" (Sophie Huchette, University of Sciences and Technics of Lille, 1992), se ha demostrado que las reacciones que participan en la oxidorreducción de cetopentosas se catalizan mediante dos enzimas diferentes.

Por lo tanto, la cepa hospedante tiene una enzima definida como D-cetopentosa-oxidoreductasa específica para NADPH, formadora de D-arabitol a partir de D-ribulosa y formadora de xilitol a partir de D-xilulosa. La cepa hospedante también posee una D-cetopentosa-oxidoreductasa específica para NADH, formadora de ribitol y xilitol, respectivamente, a partir de D-ribulosa y D-xilulosa. Esta enzima es próxima a la conocida xilitol deshidrogenasa específica para NAD⁺ E.C 1.1.1.9 de *Pichia stipitis* (XYL2). Dado que solo hay D-ribulosa intracelular disponible con respecto a D-xilulosa, la cepa hospedante equilibra el par de oxidorreducción NADPH/NADP⁺ directamente con la reoxidación de NADPH a través de la formación citosólica de D-arabitol a partir de D-ribulosa. A continuación, se secreta D-arabitol en el caldo a través de una difusión pasiva.

Los inventores hallaron que la falta de D-xilulosa intracelular sería la principal razón para la no producción de xilitol por parte de la cepa hospedante, incluso si *Pichia ohmeri* posee todas las herramientas enzimáticas para producir este poliol a través de D-cetopentosa-oxidoreductasa específica para NADH o NADPH.

De hecho, se eligió clonar en la cepa hospedante natural *Pichia ohmeri* un gen codificante de una proteína que posee actividad de D-arabitol 4-oxidoreductasa específica de NAD⁺ (formadora de D-xilulosa) (E.C.1.1.1.11) permitiendo que el D-arabitol citosólico se convirtiera en D-xilulosa y NADH.

Por lo tanto, la D-xilulosa intracelular se vuelve disponible en la cepa genéticamente modificada y podría reducirse mediante la D-cetopentosa-oxidoreductasa específica para NADH y NADPH intrínseca. Sin embargo, la cepa carece de las enzimas endógenas capaces de transformar de manera eficaz D-xilulosa en xilitol. Por consiguiente, es necesario manipular genéticamente la cepa para introducir una xilitol deshidrogenasa heteróloga.

En la patente WO 94/10325, se eligió clonar la xilitol deshidrogenasa específica para NAD⁺ (E.C 1.1.1.9) de *Pichia stipitis* (XYL2) permitiendo la producción de xilitol y equilibrando el par de oxidorreducción NADH/NAD⁺ con la oxidación de NADH producido por la etapa metabólica previa. Pero como se mencionó antes, los resultados no son realmente convincentes.

Los inventores hallaron que, al clonar un gen que codifica una proteína mutada que posee xilitol deshidrogenasa específica para NADPH, la D-xilulosa se convierte en xilitol para equilibrar el par de oxidorreducción NADPH/NADP⁺ tal como se hace mediante la producción intrínseca de D-arabitol a partir de D-ribulosa.

Debido a su baja afinidad de la D-cetopentosa-oxidoreductasa específica para NADPH con D-arabitol, la cepa hospedante natural *Pichia ohmeri* no consume el D-arabitol extracelular.

Debido a la introducción de una actividad de D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ (formadora de D-xilulosa) en la cepa genéticamente modificada, el D-arabitol producido en el caldo podría ser consumido por la cepa modificada de la misma forma que el D-arabitol citosólico.

En consecuencia, el xilitol se produce al mismo tiempo a partir del D-arabitol intracelular y extracelular.

Su producción se podría mejorar al potenciar la eficacia de la extensión de la vía del xilitol para evitar completamente la exportación del D-arabitol intermediario.

- 5 Por lo tanto, se produciría solo xilitol a partir de D-glucosa con el mismo efecto fisiológico que D-arabitol. Esta mejora podría resultar de las modificaciones genéticas, pero también de la adaptación de las condiciones de cultivo.

La elección de las dos actividades enzimáticas que se clonarán en la cepa hospedante

La elección de estas dos actividades enzimáticas se fundamenta por su especificidad de cofactor, según se describe anteriormente.

La primera enzima oxida D-arabitol en D-xilulosa.

- 10 Se conocen dos tipos de D-arabitol deshidrogenasas: Formadora de D-xilulosa (EC 1.1.1.11) (D-arabinitol:4-oxidoreductasa NAD⁺) y formadora de D-ribulosa (EC 1.1.1.250). A menos que se indique de cualquier otra manera, en la presente memoria se pretende usar la deshidrogenasa formadora D-xilulosa y se denomina en la presente memoria arabitol deshidrogenasa. Las deshidrogenasas formadoras de D-ribulosa se encuentran en levaduras y hongos naturales.
- 15 Las arabitol deshidrogenasas formadoras de D-xilulosa se conocen principalmente en bacterias. Por ejemplo, se han identificado en *Enterobacteriaceae*, en particular *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, y *Aerobacter aerogenes* cepa PRL-R3, en *Gluconobacter oxydans* y adicionalmente también en *Pichia stipitis*. En particular, se mencionan diversas enzimas en la base de datos UniprotKB, tales como, *Klebsiella pneumoniae* (n.º 052720), *Ralstonia solanacearum* (n.º P58708), *Yersinia pestis* (n.º P58709), *Aerobacter aerogenes* (n.º L8BEF0), *E. coli* (n.º K3EX35, I2ZSJ5, W1BYD6, W1H8N7, E7U4R7).
- 20

- A los efectos de la presente invención, *Escherichia coli* es la fuente preferida del gen de D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ (formadora de D-xilulosa). Más específicamente, su secuencia de aminoácidos se describe en la sec. con núm. de ident. 2. En particular, las secs. con núms. de ident. 1 y 3 describen ácidos nucleicos que codifican D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *Escherichia coli*. La secuencia codificante se ha optimizado para *Pichia ohmeri* al tomar en cuenta su especificidad codónica.
- 25

La segunda enzima convierte D-xilulosa en xilitol.

- Aunque la mayoría de las levaduras y hongos poseen un gen endógeno de xilitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.9), el cambio de su especificidad de cofactor de NADH a NADPH es necesario para la implementación de la presente invención. De hecho, un aspecto esencial de la presente invención es el uso de una xilitol deshidrogenasa específica para NADPH. Además, esta enzima preferiblemente se sobreexpresa en el hospedante.
- 30

- Se conocen numerosas xilitol deshidrogenasas y diversos artículos científicos enseñan cómo cambiar la especificidad de cofactor de NADH a NADPH. Watanabe et al (J; Biol. Chem., 2005, 280, 10340-10345) describen una xilitol deshidrogenasa mutada de *Pichia stipitis* con una especificidad de cofactor modificada, especialmente el mutante triple (D207A/I208R/F209S) y el mutante cuádruple (D207A/I208R/F209S/N211R). La secuencia de aminoácidos del mutante cuádruple se describe en la sec. con núm. de ident. 5. Un mutante doble de xilitol deshidrogenasa de *Gluconobacter oxydans* (D38S/M39R) con una especificidad de cofactor para NADPH se describe en Ehrensberger et al (2006, Structure, 14, 567-575). La secuencia de aminoácidos del mutante doble se describe en la sec. con núm. de ident. 8.
- 35

- Los inventores han preparado la mutación y la clonación de la secuencia de ácido nucleico de *Pichia stipitis* XYL2 que codifica la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH. En particular, las secs. con núms. de ident. 4 y 6 describen ácidos nucleicos que codifican xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Pichia stipitis*.
- 40

- Alternativamente, los inventores también han llevado a cabo la mutación y la clonación de la secuencia de ácido nucleico de *Gluconobacter oxydans* que codifica la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH. En particular, las secs. con núms. de ident. 7 y 9 describen ácidos nucleicos que codifican xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans*. La secuencia codificante se ha optimizado para *Pichia ohmeri* al tomar en cuenta su especificidad codónica.
- 45

Casete de expresión, vector y célula hospedante recombinante

- En un aspecto específico, la presente descripción se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante optimizada para *Pichia ohmeri* seleccionada del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident. 1, 3, 7 y 9.
- 50

También se refiere a un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante optimizada para *Pichia ohmeri* seleccionada del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident. 1, 3, 7 y 9.

Se refiere, además, a la construcción de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident. 4 y un ácido nucleico que comprende dicha construcción de ácido nucleico.

Además, se refiere a un vector recombinante, en particular un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico o casete de expresión. Generalmente, un casete de expresión comprende todos los elementos necesarios para la transcripción y traducción del gen en una proteína. En particular, comprende un promotor, opcionalmente un potenciador, un terminador de la transcripción y los elementos para la traducción. Más particularmente, el promotor que se usa para controlar la expresión de la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH se selecciona para accionar una expresión intensa. De hecho, esta enzima preferiblemente se sobreexpresa en la célula hospedante. Dichos promotores son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el promotor podría ser el promotor de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* (poRR) o el fosfoglicerato cinasa de *P. ohmeri* (poPGK1).

Se refiere a un vector recombinante, en particular un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ y un ácido nucleico que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH. También se refiere a un kit que comprende un vector recombinante, en particular un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ y un vector recombinante, en particular un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH.

Preferiblemente, dichas D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ y xilitol deshidrogenasa específica para NADPH se seleccionan entre las enzimas descritas anteriormente. En particular, dicha D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident. 2 o una secuencia con 1-3 adiciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos. En particular, dicha xilitol deshidrogenasa específica para NADPH comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident. 5 u 8 o una secuencia con 1-3 adiciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos.

Un vector preferido es un plásmido. Los plásmidos adecuados son conocidos para el experto en la técnica y, por ejemplo, se pueden seleccionar entre aquellos descritos específicamente en los Ejemplos.

El hospedante genéticamente modificado de la invención se produce primero mediante la clonación de los genes que codifican la D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ y la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH bajo el control de promotores adecuados en un vector recombinante y se introduce en la célula hospedante del organismo productor de D-arabitol mediante transformación.

La presente invención se refiere a una célula hospedante recombinante o genéticamente manipulada que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica una xilitol deshidrogenasa específica para NADPH. La D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ usa D-arabitol como sustrato y produce D-xilulosa como producto. La xilitol deshidrogenasa específica para NADPH usa D-xilulosa como sustrato y produce xilitol. La secuencia codificante de la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH y la D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ puede ser episómica o se puede integrar en el cromosoma de la célula hospedante. De hecho, los transformantes genéticamente estables se construyen preferiblemente a través de sistemas de transformación que usan un vector, por medio del cual se integra un ADN deseado en el cromosoma hospedante. Dicha integración se produce *de novo* dentro de la célula o puede ser asistida por transformación con un vector que se inserta funcionalmente en el cromosoma hospedante, con elementos de ADN que promueven la integración de secuencias de ADN en los cromosomas.

La célula hospedante se selecciona entre los microorganismos detallados anteriormente. En una realización preferida, la célula hospedante es *Pichia ohmeri*.

La presente invención se refiere a un método para producir xilitol que comprende cultivar la célula hospedante recombinante o genéticamente manipulada en un medio de cultivo y recuperar el xilitol producido. Preferiblemente, el medio de cultivo proporciona al microorganismo la fuente de carbono conveniente. La fuente de carbono incluye, preferiblemente, D-glucosa, y diversos jarabes que contienen D-glucosa y mezclas de D-glucosa con otros azúcares. El método puede comprender, además, una etapa de purificación del xilitol.

El xilitol producido por dichas cepas genéticamente modificadas se puede purificar del medio de los hospedantes de la invención según cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, US 5.081.026, incorporada a la presente memoria a modo de referencia, describe la separación cromatográfica de xilitol de los cultivos de levadura. Por lo tanto, a partir de la etapa de fermentación, se puede purificar el xilitol del medio de cultivo usando etapas cromatográficas según se describe en US 5.081.026, seguido de cristalización.

Otros rasgos característicos y ventajas de la invención serán evidentes tras la lectura de los siguientes Ejemplos. Sin embargo, se proporcionan en la presente solo como ejemplo y no son limitantes.

Figuras y secuencias

Figura 1: 12 ABYWMP: Mapa de restricción de la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ sintetizada a partir de *E. coli* flanqueada por los sitios de restricción *Ascl* y *SphI*.

Figura 2a: lig7.78: Mapa de restricción de la xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *Pichia stipitis*.

5 Figura 2b: 12AALQTP: Mapa de restricción de la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH sintetizada a partir de *Pichia stipitis* flanqueada por los sitios de restricción *HindIII* y *SacII*.

Figura 3: 13AAYSYP: Mapa de restricción de la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH sintetizada a partir de *Gluconobacter oxydans* flanqueada por los sitios de restricción *Ascl* y *SphI*.

Figura 4: Construcción de un casete de expresión que consiste en un marco de lectura abierto flanqueado por un promotor y terminador poRR usando PCR de superposición.

10 Figura 5: 12 AAMCJP: Mapa de restricción de la tagatosa-3-epimerasa sintetizada de *Pseudomonas cichorii* flanqueada por los sitios de restricción *HindIII* y *SacII*.

Figura 6: Construcción de vectores versátiles de *P. ohmeri* con marcadores de selección poLEU2 y poURA3.

15 Figura 7: pEVE2523: Mapa de restricción del vector de expresión de *P. ohmeri* poURA3 pEVE2523, con un casete de expresión clonado que contiene el marco de lectura abierto de tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* flanqueado por un promotor y terminador de ribulosa reductasa (poRR) de *P. ohmeri*.

Figura 8: pEVE2560: Mapa de restricción del vector de expresión de *P. ohmeri* poLEU2 pEVE2560, con un casete de expresión clonado que contiene el marco de lectura abierto de tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* flanqueado por un promotor y terminador de ribulosa reductasa (poRR) de *P. ohmeri*.

20 Figura 9: Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans*.

Figura 10: pEVE3284: Mapa de restricción del vector de expresión de *P. ohmeri* pEVE3284, con un casete de expresión clonado que contiene la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans* flanqueado por un promotor y terminador de ribulosa reductasa (poRR) de *P. ohmeri*.

25 Figura 11: Construcción de vectores de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Pichia stipitis*.

Figura 12: pEVE2562/pEVE2564: Mapa de restricción de los vectores de expresión de *P. ohmeri* pEVE2562/pEVE2564, con un casete de expresión clonado que contiene la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Pichia stipitis* flanqueado por un promotor y terminador de ribulosa reductasa (poRR) de *P. ohmeri* con ya sea un marcador de selección poURA3 o poLEU2, respectivamente.

30 Figura 13: Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *Pichia stipitis*.

Figura 14: pEVE2563: Mapa de restricción del vector de expresión de *P. ohmeri* pEVE2563, con un casete de expresión clonado que contiene la xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *Pichia stipitis* flanqueado por un promotor y terminador de ribulosa reductasa (poRR) de *P. ohmeri*.

35 Figura 15: Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* bajo el control del promotor y terminador de ribulosa reductasa (poRR) de *P. ohmeri* usando un marcador de selección poURA3.

40 Figura 16: pEVE2839: Mapa de restricción del vector de expresión de *P. ohmeri* pEVE2839, con un casete de expresión clonado que contiene la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* flanqueado por un promotor y terminador de ribulosa reductasa (poRR) de *P. ohmeri*.

Figura 17: Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* bajo el control del promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y el terminador de transcetolasa (poTKL) de *P. ohmeri* usando un marcador de selección poURA3.

45 Figura 18: pEVE3102: Mapa de restricción del vector de expresión de *P. ohmeri* pEVE3102, con un casete de expresión clonado que contiene la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* flanqueado por un promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y el terminador de ribulosa reductasa (poRR) de *P. ohmeri*.

50 Figura 19: pEVE3123: Mapa de restricción del vector de expresión de *P. ohmeri* pEVE3123, con un casete de expresión clonado que contiene la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* flanqueado por un promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y un terminador de transcetolasa (poTKL) de *P. ohmeri* y un marcador de selección poURA3.

Figura 20: Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* bajo el control del promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y el terminador de transcetolasa (poTKL) de *P. ohmeri* usando un marcador de selección poLEU2.

5 Figura 21: pEVE3157: Mapa de restricción del vector de expresión de *P. ohmeri* pEVE3157, con un casete de expresión clonado que contiene la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* flanqueado por un promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y un terminador de transcetolasa (poTKL) de *P. ohmeri* y un marcador de selección poLEU2.

LISTADO DE SECUENCIAS

Sec. con núm. de ident.	Descripción
1	Secuencia que codifica D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD ⁺ de <i>E. coli</i> flanqueada por los sitios de restricción <i>Ascl</i> y <i>SphI</i>
2	Secuencia de aminoácidos de D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD ⁺ de <i>E. coli</i>
3	Secuencia que codifica D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD ⁺ de <i>E. coli</i>
4	Secuencia que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de <i>Pichia stipitis</i> flanqueada por los sitios de restricción <i>HindIII</i> y <i>SacII</i> .
5	Secuencia de aminoácidos de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de <i>P. stipitis</i>
6	Secuencia que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de <i>Pichia stipitis</i>
7	Secuencia que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de <i>Gluconobacter oxydans</i> flanqueada por los sitios de restricción <i>Ascl</i> y <i>SphI</i> .
8	Secuencia de aminoácidos de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de <i>Gluconobacter oxydans</i>
9	Secuencia que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de <i>Gluconobacter oxydans</i>
10	Secuencia que codifica tagatosa-3-epimerasa de <i>Pseudomonas cichorii</i> ST24
11	Secuencia de aminoácidos de tagatosa-3-epimerasa de <i>Pseudomonas cichorii</i> ST24

10 Ejemplos

Ejemplo 1. Elección de una cepa de *Pichia ohmeri* como preferida para la manipulación genética

Como cepa hospedante elegida, *Pichia ohmeri*:

- es una productora de cantidades significativas de arabitol a partir de glucosa, en medio a presión osmótica elevada, por ejemplo, medio que contiene 10-60 % de D-glucosa y, preferiblemente, 25 % de D-glucosa (el medio "Normal" habitualmente contiene solo 2-3 % de glucosa).
- tiene un equilibrio de oxidoreducción que permite la generación de los cofactores necesarios.

Como ilustración de sus rendimientos, las siguientes tablas indican las actividades enzimáticas que participan en la vía metabólica del arabitol de *Pichia ohmeri* (Sophie HUCHETTE Thesis, 1992)

La vía de hexosa monofosfato: de glucosa-6-P a D-ribulosa-5-P y D-xilulosa-5-P

- 20 La parte oxidativa de la PPP, también denominada vía de hexosa monofosfato (HMP, por sus siglas en inglés), es una vía productora de NADPH. Las dos enzimas dependientes de NADP⁺ que son glucosa-6-P deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49) y 6-P-gluconato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.44) participan en la oxidación de 1 mol de glucosa-6-P en 1 mol de D-ribulosa-5-P y generan 2 moles de NADPH.

Tabla 1

Vía de hexosa monofosfato en <i>P. ohmeri</i> ATCC 20209	
Enzimas	Actividad específica U/mg
G6P deshidrogenasa NADP ⁺	1,5
6PG deshidrogenasa NADP ⁺	0,55
<i>Una unidad de actividad enzimática se definió como el consumo de 1 µmol de NAD(P)H o NAD(P)⁺ por minuto por mL de extracto bruto. Una unidad de actividad específica se definió como una unidad de actividad enzimática por mg de proteínas en el extracto bruto.</i>	

Se determinaron los parámetros cinéticos de las siguientes enzimas: D-ribulosa-5-P 3-epimerasa (E.C 5.1.3.1), D-ribosa-5-P ceto-isomerasa (E.C.5.3.1.6), transcetolasa (E.C.2.2.1.1) y fosfatasas ácidas (E.C. 3.1.3.2).

5

Tabla 2

Parámetros cinéticos de enzimas usando D-Ribulosa-5-P como sustrato en <i>P. ohmeri</i> ATCC 20209		
Enzimas	K_M mM	V_M U/mg
D-Ribulosa-5-P 3-epimerasa	6,3	3
D-Ribosa-5-P ceto-isomerasa	0,35	1,8
Fosfatasa ácida	4,3	0,65
<i>Una unidad de actividad enzimática se definió como el consumo de 1 µmol de NAD(P)H o NAD(P)⁺ por minuto por mL de extracto bruto. Una unidad de actividad específica se definió como una unidad de actividad enzimática por mg de proteínas en el extracto bruto.</i>		

Tabla 3

Parámetros cinéticos de enzimas usando D-Xilulosa-5-P como sustrato en <i>P. ohmeri</i> ATCC 20209		
Enzimas	K_M mM	V_M U/mg
D-Ribulosa-5-P 3-epimerasa	6,6	0,7
Transcetolasa (D-ribosa-5-P)	0,2	0,9
Transcetolasa (Eritrosa-4-P)	0,6	1,45
Fosfatasa ácida	16	0,11
<i>Una unidad de actividad enzimática se definió como el consumo de 1 µmol de NAD(P)H o NAD(P)⁺ por minuto por mL de extracto bruto. Una unidad de actividad específica se definió como una unidad de actividad enzimática por mg de proteínas en el extracto bruto.</i>		

10 *In vivo*, D-xilulosa-5-P, sintetizada a partir de la epimerización de D-ribulosa-5-P, ingresa de manera eficaz en la parte no oxidativa de la PPP a través de la transcetolización. En consecuencia, D-xilulosa-5-P no está disponible para su desfosforilación en D-xilulosa.

D-cetopentosa-oxidoreductasas específicas para NADH y NADPH

D-ribulosa y D-xilulosa se producen por la desfosforilación de D-ribulosa-5-P y D-xilulosa-5-P.

Las constantes de Michaelis-Menten destacan las afinidades de las D-cetopentosa-oxidorreductasas con NADH y NADPH para cada sustrato y las velocidades máximas correspondientes.

Tabla 4

Parámetros cinéticos de D-cetopentosa-oxidorreductasa específica para NADH de <i>P. ohmeri</i> ATCC 20209		
<i>Sustrato</i>	<i>K_M mM</i>	<i>V_M U/mg</i>
D-ribulosa	90	1
Ribitol	16	0,16
D-xilulosa	5	0,6
Xilitol	7	0,2
<i>Una unidad de actividad enzimática se definió como el consumo de 1 μmol de NAD(P)H o NAD(P)+ por minuto por mL de extracto bruto. Una unidad de actividad específica se definió como una unidad de actividad enzimática por mg de proteínas en el extracto bruto.</i>		

- 5 La D-cetopentosa-oxidorreductasa específica para NADH, formadora de ribitol y xilitol, respectivamente, a partir de D-ribulosa y D-xilulosa, exhibe una afinidad más alta con D-xilulosa que con D-ribulosa. La reacción inversa muestra una buena afinidad con xilitol y ribitol, lo que explica el buen crecimiento de la cepa hospedante en estos dos polioles.

Tabla 5

Parámetros cinéticos de D-cetopentosa-oxidorreductasa específica para NADPH de <i>P. ohmeri</i> ATCC 20209		
<i>Sustrato</i>	<i>K_M mM</i>	<i>V_M U/mg</i>
D-ribulosa	72	3,4
D-Arabitol	1300	0,8
D-xilulosa	262	1,5
Xilitol	200	0,15
<i>Una unidad de actividad enzimática se definió como el consumo de 1 μmol de NAD(P)H o NAD(P)+ por minuto por mL de extracto bruto. Una unidad de actividad específica se definió como una unidad de actividad enzimática por mg de proteínas en el extracto bruto.</i>		

- 10 La D-cetopentosa-oxidorreductasa específica para NADPH, formadora de D-arabitol a partir de D-ribulosa y formadora de xilitol a partir de D-xilulosa exhibe una afinidad más alta con D-ribulosa que con D-xilulosa. La reacción inversa muestra una afinidad muy baja con D-arabitol, lo que explica el no crecimiento de la cepa hospedante en este poliol.

- 15 Las dos cetopentosa-oxidorreductasas de la cepa hospedante se caracterizaron como diferentes de las enzimas previas descritas en *Saccharomyces rouxii* por Ingram and Wood, 1965 (Journal of Bacteriology, tomo 89, n.º 5, 1186-1194). De hecho, en *Saccharomyces rouxii*, no se detectó reacción directa en D-ribulosa y NADH y se detectó una reacción inversa en D-arabitol con NADPH.

La relación de Haldane predice las conductas cinéticas enzimáticas *in vivo*.

Tabla 6

Determinación de constantes de Haldane: D-cetopentosa-oxidoreductasa específica para NADH	
<i>Sustrato/Producto</i>	<i>K_{eq} mM⁻¹</i>
D-Ribulosa/Ribitol	78
D-Xilulosa/Xilitol	104
Determinación de constantes de Haldane: D-cetopentosa-oxidoreductasa específica para NADPH	
<i>Sustrato/Producto</i>	<i>K_{eq} mM⁻¹</i>
D-Ribulosa/D-Arabitol	104
D-Xilulosa/Xilitol	24

Las dos enzimas favorecen la reacción directa (oxidación de D-cetopentosa) con respecto a la reacción inversa (reducción de pentitol).

- 5 La PPP en la cepa hospedante es extremadamente eficaz y se generan 2 moles de NADPH a partir de 1 mol de glucosa consumido. En consecuencia, habría un exceso de NADPH disponible para reacciones anabólicas y reacciones de mantenimiento. La cepa hospedante debe producir D-arabitol a partir de D-ribulosa o xilitol a partir de D-xilulosa para equilibrar el par de oxidorreducción NADPH/NADP⁺.

- 10 El efecto inhibitorio de NADP⁺ sobre la D-cetopentosa-oxidoreductasa específica para NADPH se ha determinado *in vitro*. La actividad es 80 % menor cuando se agrega un exceso de NADP⁺. Incluso si esta concentración no es compatible con la concentración de NADP⁺ intracelular, este resultado proporciona una perspectiva sobre la función de la D-cetopentosa oxidoreductasa específica para NADPH en el equilibrio del par de oxidorreducción NADPH/NADP⁺.

- 15 La cepa hospedante produce solo D-arabitol a partir de D-ribulosa dado que D-xilulosa no está disponible debido al ingreso de D-xilulosa-5-P en la parte no oxidativa de la PPP.

La relación entre la producción de D-arabitol y el equilibrio de oxidorreducción de NADPH/NADP⁺ se ha demostrado en la cepa hospedante al evaluar el impacto de la sobreexpresión de Glucosa-6-P deshidrogenasa sobre la producción de D-arabitol. Por consiguiente, la cepa obtenida alberga una actividad de G6PDH 1,5 veces más alta y produce 10 % más de D-arabitol en comparación con la cepa hospedante (FR2772788).

20 Ejemplo 2. Uso de codones de *Pichia ohmeri*

El uso de codones de *P. ohmeri* se determinó a partir del ADN disponible y la secuencia de aminoácidos correspondiente de cinco genes de *P. ohmeri*: transcetolasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (FR 2772788), ribulosa reductasa, beta-isopropilmalato deshidrogenasa - *LEU2* (Piredda and Gaillardin, Yeast, tomo 10:1601-1612 (1994) y orotidina-5'-fosfato descarboxilasa - *URA3* (Piredda and Gaillardin, 1994, *supra*).

- 25 Cada gen individual se dividió en tripletes nucleotídicos que codifican un único aminoácido. Los cinco genes consistían en un total de 2091 codones.

Para cada aminoácido, se contó la cantidad de cada codón presente en los cinco genes, dividida entre 2091 y multiplicada por 1000. De este modo, se estimó la frecuencia de un codón específico en 1000 codones.

El uso de codones preliminar de *P. ohmeri* se representa en la Tabla 7.

- 30 Todos los genes heterólogos expresados en *P. ohmeri*, excepto la xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis*, se optimizaron por codón usando esta tabla y el programa Optimizer obtenido de <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>.

La secuencia obtenida se envió para síntesis génica después de la adición manual de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción en los respectivos extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de la enzima.

Tabla 7. Tabla de uso de codones de *P. ohmeri* derivada de 5 secuencias codificantes (CDS, por sus siglas en inglés)

<i>Pichia ohmeri</i> [gbpln]: 5 CDS (2091 codones) campos: [triplete] [frecuencia: por mil] ([cantidad])											
TTT	10,5(	22)	TCT	30,6(	64)	TAT	7,7(	16)	TGT	5,7(	12)
TTC	30,1(	63)	TCC	23,4(	49)	TAC	27,3(	57)	TGC	1,4(	3)
TTA	5,3(	11)	TCA	4,8(	10)	TAA	1,4(	3)	TGA	0,0(	0)
TTG	64,1(	134)	TCG	9,6(	20)	TAG	1,0(	2)	TGG	12,9(	27)
CTT	10,5(	22)	CCT	12,0(	25)	CAT	3,3(	7)	CGT	5,7(	12)
CTC	12,0(	25)	CCC	0,0(	0)	CAC	15,8(	33)	CGC	1,0(	2)
CTA	0,0(	0)	CCA	34,0(	71)	CAA	12,4(	26)	CGA	0,0(	0)
CTG	2,9(	6)	CCG	0,5(	1)	CAG	17,7(	37)	CGG	0,5(	1)
ATT	27,7(	58)	ACT	22,0(	46)	AAT	7,7(	16)	AGT	1,9(	4)
ATC	30,6(	64)	ACC	24,4(	51)	AAC	29,2(	61)	AGC	2,4(	5)
ATA	2,4(	5)	ACA	3,3(	7)	AAA	11,0(	23)	AGA	26,3(	55)
ATG	14,3(	30)	ACG	1,4(	3)	AAG	64,1(	134)	AGG	0,0(	0)
GTT	27,3(	57)	GCT	46,9(	98)	GAT	23,0(	48)	GGT	60,7(	127)
GTC	19,1(	40)	GCC	27,7(	58)	GAC	35,9(	75)	GGC	10,5(	22)
GTA	1,9(	4)	GCA	11,0(	23)	GAA	18,7(	39)	GGA	12,0(	25)
GTG	21,5(	45)	GCG	3,3(	7)	GAG	46,9(	98)	GGG	1,0(	2)

Ejemplo 3. Clonación del gen de D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ (formadora de D-xilulosa) bacteriano de *E. coli*

Un fragmento de ADN que codifica el altD de D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* se sintetizó químicamente (GeneArt® Gene Synthesis, Life Technologies, Regensburg, Alemania), según la secuencia enviada de la secuencia enviada de la sec. con núm. de ident.: 1.

Los nucleótidos 1441 a 2808 de la secuencia AF378082.1 (obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF378082>) que codifica el gen altD se usaron como plantilla y se sometieron a optimización por codón para su uso en *P. ohmeri* ATCC 20209 según la Tabla 7 del ejemplo 2, usando el programa Optimizer obtenido de <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>.

En los extremos 5' y 3' de la secuencia resultante, se agregaron nucleótidos que codifican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Ascl* (GGCGCGCC) y *SphI* (GCATGC), respectivamente, para facilitar la clonación adicional.

Además, se incluyó un triplete de adenosina adelante del ATG inicial para compensar una adenosina en la posición -3 en la secuencia de levaduras similares a Kozak.

A continuación, la secuencia final (sec. con núm. de ident.: 1) se envió para su síntesis (GeneArt, Regensburg, Alemania).

El fragmento de ADN sintetizado que codificaba la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* se suministró como 5 µg de ADN plasmídico liofilizado en un vector derivado de pMK-RQ (12ABYWMP, Figura 1).

Para la subclonación adicional, el gen se liberó mediante corte de restricción con las enzimas *AscI* y *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts).

5 Ejemplo 4. Mutagénesis y clonación de xilitol deshidrogenasa específica para NADH y NADPH de *Pichia stipitis*

Clonación de xilitol deshidrogenasa específica para NADH de Pichia stipitis

La secuencia de nucleótidos conocida del gen de levadura *XYL2* (*Pichia stipitis*), que codifica xilitol deshidrogenasa (Kötter et al., Curr. Genet. 18:493-500 (1990)) se clonó en el vector plasmídico lig 7.78 siguiendo las instrucciones de FR 2 765 589 (véase el ejemplo 4 y la Figura 7 de la presente patente). El mapa de restricción del vector se presenta en la Figura 2a.

Mutagénesis y clonación de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de Pichia stipitis

Un fragmento de ADN que codifica el *XYL2* de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Pichia stipitis* se sintetizó químicamente (GeneArt® Gene Synthesis, Life Technologies, Regensburg, Alemania) según la secuencia de la sec. con núm. de ident. 4):

15 Los nucleótidos 319 a 1410 de la secuencia X55392.1 (obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X55392.1>) que codifica el gen *XYL2* se usaron como plantilla.

Según el artículo de Watanabe et al. (J; Biol. Chem., 2005, 280, 10340-10345), la preferencia de cosustrato de la xilitol deshidrogenasa se podría cambiar de NADH a NADPH mediante la introducción de cuatro mutaciones de aminoácido publicadas: D207A/I208R/F209S/N211R (numeración basada en la secuencia proteica P22144 obtenida de <http://www.uniprot.org/uniprot/P22144>).

Por consiguiente, los codones que codifican D207, I208, F209 y N211 se reemplazaron manualmente por GCT, AGA, TCA y AGA en la secuencia correspondiente, respectivamente.

Además, los nucleótidos que codifican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *HindIII* (AAGCTT) y *SacII* (CCGCGG) se incluyeron manualmente en los respectivos extremos 5' y 3' para facilitar la clonación adicional.

25 Adicionalmente, se incluyó un triplete de adenosina adelante del ATG inicial para compensar una adenosina en la posición -3 en la secuencia de levaduras similares a Kozak. La secuencia final (sec. con núm. de ident.: 4) se envió para su síntesis (GeneArt, Regensburg, Alemania).

El fragmento de ADN sintetizado que codificaba la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *P. stipitis* se suministró como 5 µg de ADN plasmídico liofilizado en un vector derivado de pMA-T (12AALQTP, Figura 2b).

30 Ejemplo 5. Mutagénesis y clonación de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans*

Un fragmento de ADN que codifica el *Xdh* de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans* se sintetizó químicamente (GeneArt® Gene Synthesis, Life Technologies, Regensburg, Alemania) según la secuencia enviada de la sec. con núm. de ident.: 7.

35 Los nucleótidos 1063 a 1851 de la secuencia AB091690.1 (obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB091690.1>) que codifica el gen *Xdh* se usaron como plantilla y se sometieron a optimización por codón para su uso en *P. ohmeri* ATCC 20209 según la Tabla 7 (Ejemplo 2), usando el programa Optimizer obtenido de <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>.

Según la publicación de Ehrensberger et al. (Structure, 2006, 14, 567-575), la especificidad de cosustrato de la enzima se podría cambiar de NADH a NADPH mediante la introducción de dos mutaciones de aminoácido publicadas: D38S/M39R (numeración basada en la secuencia proteica Q8GR61 obtenida de <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8GR61>).

40 Por consiguiente, los codones que codifican D38 y M39 se reemplazaron manualmente por TCT y AGA en la secuencia correspondiente, respectivamente. Además, los nucleótidos que codifican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *AscI* (GGCGCGCC) y *SphI* (GCATGC) se incluyeron manualmente en los respectivos extremos 5' y 3' para facilitar la clonación adicional.

Adicionalmente, se incluyó un triplete de adenosina adelante del ATG inicial para compensar una adenosina en la posición -3 en la secuencia de levaduras similares a Kozak. La secuencia final (sec. con núm. de ident.: 7) se envió para su síntesis (GeneArt, Regensburg, Alemania).

50 El fragmento de ADN sintetizado que codificaba la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans* se suministró como 5 µg de ADN plasmídico liofilizado en un vector derivado de pMA-T (13AAYSYP, Figura

3). Para la subclonación adicional, el gen se liberó mediante corte de restricción con las enzimas *Ascl* y *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts).

Ejemplo 6. Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la expresión génica heteróloga usando el marcador de selección poURA3

5 La clonación de un vector con:

- promotor,
- marco de lectura abierto y
- elementos terminadores

10 reemplazables se llevó a cabo mediante dos PCR de superposición sucesivas de tres fragmentos individuales (Figura 4).

El vector se planificó originalmente como un modelo de expresión para evaluar la clonación y la sobreexpresión del gen de tagatosa 3-epimerasa en la cepa de *Pichia ohmeri* recombinante.

15 Según se describirá más adelante, el gen de tagatosa 3-epimerasa se clonó en un casete con sitios de restricción *Ascl* - *SphI* específicos, permitiendo la clonación de cualquier gen de interés al usar estos mismos sitios de inserción.

La clonación se concibió de la siguiente manera.

En una primera PCR (PCR1), se amplificó un fragmento del promotor de ribulosa reductasa de 490 bp de longitud de *P. ohmeri* flanqueado por los sitios *SpeI* y *Ascl* (subrayados en la secuencia del cebador) usando:

- cebador EV2960:

20 GAACTAGTGGATCCGTAGAAATCTTG (sec. con núm. de ident. 12) y

- cebador EV2961:

CTTTGTTTCATTTTGGCGCGCCTTTTAGTTTAATAAGGGTCCGTG (sec. con núm. de ident. 13).

Además, en el extremo 5' del cebador inverso EV2961, se agregó un fragmento de 13 nucleótidos de longitud que representaba el extremo 5' del gen de tagatosa-3-epimerasa.

25 Este fragmento junto con los 8 nucleótidos del sitio *Ascl* y los siguientes 10 nucleótidos del extremo 3' del promotor de ribulosa reductasa eran necesarios como superposición para fusionar el fragmento de PCR1 con el fragmento de PCR2 descrito más adelante. El ADN genómico de *P. ohmeri* ATCC 20209 se usó como plantilla.

30 Después de una centrifugación a velocidad máxima, se usaron 0,5 µl del sobrenadante para la PCR. Con este fin, una colonia recientemente sembrada en estrías se resuspendió en 30 µl de SDS al 0,2 % y se calentó durante 4 min a 95 °C.

La plantilla se amplificó en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP y 0,5 µM de cada cebador con 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

35 La PCR se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C y posteriormente 25 ciclos con 10 seg a 98 °C / 20 seg a 50 °C / 15 seg a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1 %, se extrajo y purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California).

En una segunda PCR (PCR2), se amplificó un fragmento de 911 bp de longitud de tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* ST24 flanqueado por los sitios *Ascl* y *SphI* (subrayados en la secuencia del cebador) usando:

- cebador EV2962:

40 AAACTAAAAGCGCGCCAAAATGAACAAAGTTGGCATG (sec. con núm. de ident. 14) y

- cebador EV2963:

TTCTCTTCGAGAGCATGCTCAGGCCAGCTTGTCACG (sec. con núm. de ident. 15).

El extremo 5' del cebador EV2962 contiene un fragmento de 9 nucleótidos de longitud que representaba el extremo 3' del promotor de ribulosa reductasa.

Este fragmento junto con los 8 nucleótidos del sitio *Ascl* y los siguientes 12 nucleótidos del marco de lectura abierto de tagatosa-3-epimerasa, se usa para la PCR de superposición para fusionar el producto de PCR2 con el producto de PCR1 descrito anteriormente.

5 Además, el extremo 5' del cebador inverso EV2963 contiene un fragmento de 12 nucleótidos de longitud que representa el extremo 5' del terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri*.

Este fragmento junto con los 6 nucleótidos del sitio *SphI* y los siguientes 12 nucleótidos del extremo 3' del marco de lectura abierto de tagatosa-3-epimerasa son necesarios como superposición para fusionar PCR2 con el fragmento de PCR de PCR3 descrito más adelante.

10 Como plantilla, se usaron 25 ng del vector 12AAMCJP (Figura 5) (GeneArt, Regensburg, Alemania) que contenía una copia sintetizada del gen de tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* ST24 (nucleótidos 719 a 1591 de AB000361.1, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB000361>) - sec. con núm. de ident.: 11.

La plantilla se amplificó en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP y 0,5 µM de cada cebador con 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

15 La PCR se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C y posteriormente 25 ciclos con 10 seg a 98 °C / 20 seg a 48 °C / 30 seg a 72 °C y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

En una tercera PCR (PCR3), se amplificó un fragmento del terminador de ribulosa reductasa de 380 bp de longitud de *P. ohmeri* flanqueado por los sitios *SphI* y *SacII* (subrayados en la secuencia del cebador) usando:

– cebador EV2964

AAGCTGGCCTGAGCATGCTCTCGAAGAGAATCTAG (sec. con núm. de ident. 16) y

20 – cebador EV2965

GTTCCGCGGAGAATGACACGGCCGAC (sec. con núm. de ident. 17).

El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1 %, se extrajo y purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California).

25 El extremo 5' del cebador EV2964 contiene un fragmento de 12 nucleótidos de longitud del extremo 3' del marco de lectura abierto de tagatosa-3-epimerasa que, junto con los 6 nucleótidos del sitio *SphI* y los siguientes 12 nucleótidos del terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* se usan para la fusión de PCR3 con el PCR2 descrito anteriormente.

30 El ADN genómico de *P. ohmeri* ATCC 20209 se usó como plantilla. Después de una centrifugación a velocidad máxima, se usaron 0,5 µl del sobrenadante en la PCR. Con este fin, una colonia recientemente sembrada en estrías se resuspendió en 30 µl de SDS al 0,2 % y se calentó durante 4 min a 95 °C.

La plantilla se amplificó en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador y 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

35 La PCR se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C y posteriormente 25 ciclos con 10 seg a 98 °C / 20 seg a 50 °C / 15 seg a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1 %, se extrajo y purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California).

La fusión de los tres fragmentos de PCR individuales se llevó a cabo de la siguiente manera: 50 ng de cada producto purificado de gel de PCR1 y PCR2 se usaron como plantilla en una reacción de PCR con EV2960 y EV2963.

40 Un segmento homólogo de 30 nucleótidos de longitud en los dos fragmentos, resultante del diseño del cebador descrito anteriormente, se usó como superposición en la reacción de fusión.

De esta manera, se fusionó un fragmento de 1,4 kb de longitud, que consiste en un promotor de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* flanqueado por los sitios *SpeI* y *Ascl* con el marco de lectura abierto de tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* ST24.

45 Las plantillas se amplificaron en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador y 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

La PCR se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C y posteriormente 30 ciclos con 10 seg a 98 °C / 20 seg a 62 °C / 45 seg a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1 %, se extrajo y purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California).

El fragmento purificado se fusionó en una segunda PCR de superposición con el producto de PCR3. 40 ng de cada fragmento se usaron como plantilla y se amplificaron con EV2960 y EV2965.

Un segmento homólogo de 30 nucleótidos de longitud en los dos fragmentos, resultante del diseño del cebador descrito anteriormente, se usó como superposición en la fusión.

- 5 De esta manera, se fusionó un fragmento de 1,8 kb de longitud, que consiste en un promotor de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* flanqueado por los sitios *SpeI* y *Ascl* y el marco de lectura abierto de tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* ST24 flanqueado por los sitios *Ascl* y *SphI* con el terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri*.

- 10 Las plantillas se amplificaron en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador y 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

La PCR se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C y posteriormente 30 ciclos con 10 seg a 98 °C / 20 seg a 65 °C / 55 seg a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa, se extrajo y purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California).

- 15 El producto de PCR final que consistía en un fragmento de 1,7 kb de longitud de tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* ST24 flanqueada por un promotor y terminador de ribulosa reductasa se digirió con las enzimas de restricción *SpeI* y *SacII* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts), se purificó en gel y se ligó durante toda la noche a 16 °C con un fragmento aislado de 9,8 kb de longitud de *SpeI/SacII* de una estructura de vector lig7.78 usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (Figura 6).

- 20 Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico usando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research Corporation, Irvine, California). El ADN plasmídico purificado se usó para caracterización adicional mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

- 25 El plásmido de expresión recientemente clonado pEVE2523 (Figura 7) es un vector versátil de *E. coli* - *P. ohmeri* que consiste en un origen de replicación y un gen de resistencia a ampicilina bacterianos (*E. coli*), la secuencia de replicación autónoma de levadura (*P. ohmeri*), y el gen de *poURA3* (*P. ohmeri*) para la selección en levadura.

Además, contiene un elemento promotor (a través de restricción por *SpeI* y *Ascl*) y un elemento terminador (a través de *SphI* y *SacII*) intercambiables de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* que flanquean un marco de lectura abierto de la tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* (intercambiable a través de la restricción por *Ascl* y *SphI*).

- 30 Ejemplo 7. Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la expresión génica heteróloga usando el marcador de selección *poLEU2*

Para la construcción de un segundo vector de expresión de *P. ohmeri*, el casete de expresión del plásmido pEVE2523 (Figura 7) descrito anteriormente en el Ejemplo 6 se clonó en un vector que contenía el marcador de selección *poLEU2* de *P. ohmeri* (Figura 6).

- 35 Un fragmento despuntado de 1,7 kb del vector pEVE2523 (Figura 7) cortado con *SpeI* y *SacII* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) se usó como inserto. El despuntamiento se llevó a cabo con la Blunting Enzyme Mix (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente mediante inactivación térmica de las enzimas durante 10 min a 70 °C.

- 40 La estructura del vector se obtuvo de un vector *poARS* (plig3 - FR 2772788) linealizado con *SaI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts), despuntado y desfosforilado durante 1 h a 37 °C usando fosfatasa Antarctic (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts). El inserto y la estructura de vector purificados de gel usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California) se ligaron durante 1 h a TA usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts).

- 45 Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico usando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se usó para caracterización adicional mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

- 50 Los plásmidos de expresión recientemente clonados pEVE2560 (Figura 8) es un vector versátil de *E. coli* - *P. ohmeri* que contiene un origen de replicación y un gen de resistencia a ampicilina bacterianos (*E. coli*), la secuencia de replicación autónoma de levadura (*P. ohmeri*), y el gen de *poLEU2* (*P. ohmeri*) para la selección en levadura.

Además, el marco de lectura abierto de la tagatosa-3-epimerasa de *Pseudomonas cichorii* flanqueado por un promotor y terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* es intercambiable a través de la restricción por *Ascl* y *SphI*.

Ejemplo 8. Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans*.

Se construyó un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans*.

- 5 Para la clonación en el vector de expresión, el fragmento de ADN que codifica la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans* se liberó del vector 13AAYSYP (Figura 3) al cortarlo con las enzimas de restricción *Ascl* y *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts).

10 El fragmento de 803 bp se purificó del gel usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se ligó durante 2 h a temperatura ambiente con la estructura de vector de pEVE2523 (Figura 7) de 9,8 kb digerida por *Ascl/SphI* y purificada del gel usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (Figura 9).

15 Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico usando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se caracterizó adicionalmente mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

El plásmido resultante pEVE3284 (Figura 10) contiene la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans* optimizada por codón flanqueada por un promotor y terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* y el marcador de selección *poURA3*.

20 Ejemplo 9. Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Pichia stipitis*.

Para la subclonación en el vector de expresión, el fragmento de ADN que codifica la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Pichia stipitis* debía estar flanqueado por los sitios de restricción *Ascl* y *SphI*.

Con este fin:

– el cebador EV3101

- 25 AAGGCGCGCCAAA ATGACTGCTAACCCTTCC (sec. con núm. de ident. 18) que contiene un sitio *Ascl* (subrayado) y

– el cebador EV3102

GAGCATGCTTACTCAGGGCCGTCAATG (sec. con núm. de ident. 19) que contiene un *SphI* (subrayado)

se usaron en una reacción de PCR con 30 ng del vector 12AALQTP (Figura 2b) como plantilla.

- 30 La plantilla se amplificó en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP y 0,5 µM de cada cebador con 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

La PCR se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C y posteriormente 25 ciclos con 10 seg a 98 °C / 20 seg a 55 °C / 30 seg a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

- 35 El producto de PCR de 1,1 kb se separó en un gel de agarosa al 1 %, se extrajo, purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se digirió por restricción con *Ascl* y *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts). Después de la purificación en columna con el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research Corporation, Irvine, California), se ligó durante 2 h a temperatura ambiente con la estructura de vector de pEVE2523 (Figura 7) de 10,6 kb digerida por *Ascl/SphI* y purificada del gel y la estructura de vector de pEVE2560 (Figura 8) de 11,8 kb digerida por *Ascl/SphI* y purificada del gel, respectivamente, usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (Figura 11).

Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico y se caracterizó adicionalmente mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

- 45 Los plásmidos resultantes pEVE2562 y pEVE2564 (Figura 12) contienen la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Pichia stipitis* optimizada por codón flanqueada por un promotor y terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* y el marcador de selección *poURA3* o *poLEU2*, respectivamente.

Ejemplo 10. Construcción de un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *Pichia stipitis*

Para la subclonación en el vector de expresión, el fragmento de ADN que codifica la xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *Pichia stipitis* debía estar flanqueado por los sitios de restricción *Ascl* y *SphI*.

Con este fin:

- 5 – EV3101 (AAGGCGCGCCAAA ATGACTGCTAACCCTTCC) (sec. con núm. de ident. 18) que contiene un sitio *Ascl* (subrayado) y el
- EV3102 (GAGCATGCTTACTCAGGGCCGTCAATG) (sec. con núm. de ident. 19) que contiene un *SphI* (subrayado)

se usaron en una reacción de PCR con 30 ng del vector lig7.78 (Figura 2a) como plantilla.

- 10 La plantilla se amplificó en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP y 0,5 µM de cada cebador con 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

La PCR se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C y posteriormente 25 ciclos con 10 seg a 98 °C / 20 seg a 55 °C / 30 seg a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

- 15 El producto de PCR de 1,1 kb se separó en un gel de agarosa al 1 %, se extrajo, purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se digirió por restricción con *Ascl* y *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts).

Después de la purificación en columna con el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research Corporation, Irvine, California), se ligó durante 2 h a temperatura ambiente con la estructura de vector de pEVE2560 (Figura 8) de 10,5 kb digerida por *Ascl/SphI* y purificada del gel usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (Figura 13).

- 20 Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico y se caracterizó adicionalmente mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

- 25 El plásmido resultante pEVE2563 (Figura 14) contiene la xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *Pichia stipitis* optimizada por codón flanqueada por un promotor y terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* y el marcador de selección *poLEU2*.

Ejemplo 11. Construcción de vectores de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli*

Se construyó un vector de *P. ohmeri* para la sobreexpresión de D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli*.

- 30 Para la clonación en el vector de expresión, el fragmento de ADN que codifica la D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* optimizada por codón se liberó del vector 12ABYWMP (Figura 1) al cortarlo con las enzimas de restricción *Ascl* y *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts).

- 35 El fragmento de 1,4 bp se purificó del gel usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se ligó durante 2 h a temperatura ambiente con la estructura de vector de pEVE2523 (Figura 7) de 9,8 kb digerida por *Ascl/SphI* y purificada del gel usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (Figura 16).

- 40 Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico usando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se caracterizó adicionalmente mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

El plásmido resultante pEVE2839 (Figura 15) contiene la D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* optimizada por codón flanqueada por un promotor y terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* y el marcador de selección *poURA3*.

- 45 Además del promotor de ribulosa reductasa de *P. ohmeri*, la D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* también se clonó bajo el control del promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y el terminador de transcetolasa (poTKL) de *P. ohmeri*.

La clonación se llevó a cabo en dos etapas consecutivas, al reemplazar primero el promotor de ribulosa reductasa por el promotor poPGK1, y posteriormente mediante un intercambio del terminador de ribulosa reductasa por el terminador poTKL.

Un fragmento de 611 bp de longitud del promotor poPGK1 de *P. ohmeri* se amplificó a partir del ADN genómico de *P. ohmeri* usando:

- el cebador EV3177 (GAAGACTAGTTCACGTGATCTC) (sec. con núm. de ident. 20) que contiene un sitio *SpeI* (subrayado) y
- 5 – el cebador EV3178 (CACTGGCGCGCCTTTTGTGTGGTGGTGTCC) (sec. con núm. de ident. 21) que contiene un sitio *Ascl* (subrayado).

Después de una centrifugación a velocidad máxima, se usaron 0,5 µl del sobrenadante para la PCR. La plantilla de ADN genómico se preparó al resuspender una colonia recientemente sembrada en estrías en 30 µl de SDS al 0,2 % y calentar durante 4 min a 95 °C.

- 10 La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP y 0,5 µM de cada cebador con 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

La PCR se logró con una etapa de desnaturalización inicial de 2 min a 96 °C y posteriormente 25 ciclos con 10 seg a 96 °C / 10 seg a 58 °C / 30 seg a 72 °C, y una etapa de extensión final de 2 minutos a 72 °C.

- 15 El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1 %, se extrajo y purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California).

El fragmento amplificado del promotor poPGK1 de 610 bp de longitud se digirió por restricción con *SpeI* y *Ascl* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) y se ligó durante 2 h a temperatura ambiente con la estructura de vector de pEVE2839 (Figura 16) de 11,5 kb digerida por *SpeI*/*Ascl* y purificada de gel usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (Figura 17).

- 20 Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico usando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se caracterizó adicionalmente mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

- 25 El plásmido resultante pEVE3102 (Figura 18) contiene la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* optimizada por codón flanqueada por un promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y un terminador de ribulosa reductasa de *P. ohmeri* y el marcador de selección *URA3*.

En la siguiente etapa el terminador de ribulosa reductasa de pEVE3102 se intercambió por el terminador de transetolasa (poTKL) de *P. ohmeri*.

- 30 Un fragmento de 213 bp de longitud del terminador poTKL de *P. ohmeri* se amplificó a partir del ADN genómico de *P. ohmeri* usando:

- el cebador EV3817 (TAGCAGCATGCATAGGTTAGTGAATGAGGTATG) (sec. con núm. de ident. 22) que contiene un sitio *SphI* (subrayado) y
- el cebador EV3818 (TAGGTCCGCGGGAGCTTCGTAAAGGGC) (sec. con núm. de ident. 23) que contiene un sitio *SacII* (subrayado).

- 35 La plantilla de ADN genómico se preparó según se describe anteriormente.

La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción que consistía en 200 µM de cada dNTP y 0,5 µM de cada cebador con 0,02 U/µl de polimerasa iProof™ (BIO-RAD, Hercules, California) en 1X del tampón adecuado.

- 40 La PCR se logró con una etapa de desnaturalización inicial de 2 min a 96 °C y posteriormente 25 ciclos con 10 seg a 96 °C / 10 seg a 57 °C / 30 seg a 72 °C, y una etapa de extensión final de 2 minutos a 72 °C. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1 %, se extrajo y purificó usando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California).

- 45 El fragmento amplificado del terminador poTKL de 213 bp de longitud se digirió por restricción con *SphI* y *SacII* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) y se ligó durante 2 h a temperatura ambiente con la estructura de vector de pEVE3102 (Figura 18) de 11,5 kb digerida por *SphI*/*SacII* y purificada de gel usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (Figura 17).

Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico usando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se caracterizó adicionalmente mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

El plásmido resultante pEVE3123 (Figura 19) contiene la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* optimizada por codón flanqueada por un promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y un terminador de transcetolasa (poTKL) de *P. ohmeri* y el marcador de selección poURA3.

5 Para poder expresar la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* a partir de un plásmido usando otra selección, el marcador poURA3 de pEVE3123 se intercambió por el marcador poLEU2.

Con este fin, el marcador poURA3 se liberó del vector pEVE3123 (Figura 19) mediante digestión por restricción con *Pst*I y *Afe*I (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts).

10 La estructura de vector de 9,1 kb se purificó del gel usando el kit de recuperación de ADN de gel Zymoclean™ (Zymo Research Corporation, Irvine, California), se despuntó con el kit Blunting Enzyme Mix (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) durante 15 min a temperatura ambiente, y posteriormente mediante inactivación térmica de las enzimas durante 10 min a 70 °C y se desfosforiló durante 1 h a 37 °C usando fosfatasa Antarctic (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts).

15 Como inserto, se usó un fragmento de 3 kb despuntado y purificado de gel del marcador poLEU2 liberado del vector pEVE2560 (Figura 8) mediante digestión por restricción con *Ase*I y *Afe*I. La ligadura de los fragmentos se llevó a cabo durante 2 h a temperatura ambiente usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (Figura 20).

20 Después de la transformación de las células ultracompetentes XL10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, California) con la mezcla de ligadura, se aisló el ADN plasmídico usando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research Corporation, Irvine, California) y se caracterizó adicionalmente mediante digestión por restricción y secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza).

El plásmido resultante pEVE3157 (Figura 21) contiene la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* optimizada por codón flanqueada por un promotor de fosfoglicerato cinasa (poPGK1) y un terminador de transcetolasa (poTKL) de *P. ohmeri* y el marcador de selección poLEU2.

25 Ejemplo 12. Expresión de la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* plasmídica y del gel de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Pichia stipitis* plasmídico en la cepa de *Pichia ohmeri* ATCC 20209

Para la conversión biosintética de arabitol en xilitol, se necesita la expresión simultánea de la D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli* y la xilitol deshidrogenasa específica para NADP de *P. stipitis*.

La primera enzima conduce a la formación de xilulosa y la segunda convierte xilulosa en xilitol.

30 La cepa de *P. ohmeri* SRLU (*MATh⁻ leu2 ura3*) derivada de ATCC 20209 y auxótrofa para leucina y uracilo (Piredda and Gaillardin, 1994, *supra*) se usó como hospedante para la construcción de una cepa de levadura que secreta xilitol mediante transformación con plásmidos:

- pEVE2839 (D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli*) y
- pEVE2564 (xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *P. stipitis*) que conducen a la cepa EYS2755.

35 Además, como testigo (siguiendo las instrucciones de WO 94/10325) se construyó también una cepa que expresa la xilitol deshidrogenasa específica para NADH natural de *P. stipitis* mediante transformación con los plásmidos:

- pEVE2839 (D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli*) y
- pEVE2563 (xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *P. stipitis*) en la hospedante SRLU que conduce a la cepa EYS2962.

Como testigo, también se generaron cepas transformadas con plásmidos simples:

- 40
- pEVE2839 (D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD^+ de *E. coli*),
 - pEVE2563 (xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *P. stipitis*) y
 - pEVE2564 (xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *P. stipitis*) que conducen a EYS2943, EYS2696 y EYS2697, respectivamente.

45 La transformación de la levadura se llevó a cabo esencialmente mediante el método por esferoplasto de Green et al. (Green E.D., Hieter, P., y Spencer F. A., capítulo 5 en Genome Analysis: A Laboratory Manual, tomo 3, Cloning Systems, Birren et al. (eds.), Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1999) con las siguientes modificaciones: En lugar de Lyticase, se usó Zymolyase 100T para la generación de esferoplastos y la incubación con la enzima se llevó

a cabo a 37 °C hasta que la DO de la suspensión celular alcanzó el 20-30 % de la DO original antes del tratamiento con Zymolyase.

En resumen, se cultivaron células de *P. ohmeri* durante toda la noche a 30 °C en medio YPD (extracto de levadura al 1 % (p/v), Peptona al 2 % (p/v), Dextrosa al 2 % (p/v)) hasta una DO₆₀₀ final de 3-5. Se cosecharon 200 unidades de DO₆₀₀ mediante centrifugación, se lavaron una vez con agua y 1 M sorbitol, y se resuspendieron en tampón SCE (1 M sorbitol, 100 mM de sal dihidratada trisódica de ácido cítrico, 10 mM de EDTA) hasta una concentración final de 70 DO/ml.

Se agregaron DTT y Zymolase (LuBio Science, Lucerna, Suiza) hasta una concentración final de 10 mM y 0,5 U/DO, respectivamente, y la mezcla se incubó a 37 °C con agitación lenta.

Tras la digestión de la pared celular, se procedió a medir la densidad óptica de la disolución diluida en agua. Cuando este valor se redujo hasta un 80 % del original, la digestión se terminó mediante centrifugación cuidadosa y lavado con 1 M sorbitol y tampón STC (0,98 M sorbitol, 10 mM de Tris, pH 7,5, 10 mM de CaCl₂).

Los esferoplastos se resuspendieron cuidadosamente en tampón STC que contenía 50 µg/ml de ADN de timo de ternero (Calbiochem/VWR, Dietikon, Suiza) hasta una concentración final de 200 DO/ml. Se mezclaron alícuotas de 100 µl con 100-200 ng de ADN plasmídico y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente.

Se agregó 1 ml de disolución de PEG (19,6% de PEG 8000 p/v, 10 mM de Tris pH 7,5, 10 mM de CaCl₂) a la suspensión, se incubaron durante 10 minutos y se granularon. Los esferoplastos se regeneraron a 30 °C durante 1-2 h en 1 ml de una disolución de 1 M sorbitol que contenía YPD al 25 % y 7 mM de CaCl₂.

A las células regeneradas se agregaron 7 ml de agar superior caliente a 50 °C (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos al 0,67 %, polvo de desactivación sin leucina/uracilo/histidina/triptófano/metionina al 0,13 %, 0,086 % del aminoácido faltante requerido, glucosa al 2 %, 1 M sorbitol, pH 5,8 y agar Noble al 2,5 %) y la mezcla se vertió uniformemente sobre placas selectivas que contenían sorbitol precalentadas (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos al 0,67 %, polvo de desactivación sin leucina/uracilo/histidina/triptófano/metionina al 0,13 %, 0,086 % del aminoácido faltante requerido, glucosa al 2 %, 1 M sorbitol, pH 5,8).

Las placas se incubaron durante 3-5 días a 30 °C. Los transformantes se reselectaron en las placas selectivas adecuadas.

Cada cepa generada se evaluó por triplicado para determinar la producción de arabitol, xilitol y ribitol.

Con este fin, los clones primero se cultivaron a 30 °C durante toda la noche en medios de siembra (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos al 0,67 %; polvo de desactivación sin leucina/uracilo/histidina/triptófano/metionina al 0,13 %; 0,086 % del aminoácido faltante requerido, glucosa al 5 %; pH 5,7).

De este cultivo durante toda la noche, se inoculó un cultivo principal en medios de producción (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos al 0,67 %; polvo de desactivación sin leucina/uracilo/histidina/triptófano/metionina al 0,13 %; 0,086 % del aminoácido faltante requerido; glucosa al 15 %; pH 5,7) a una DO₆₀₀ de partida de 0,2.

Este cultivo se cultivó a 37 °C durante 48 horas y se determinaron las concentraciones de arabitol, xilitol y ribitol de los sobrenadantes mediante HPLC/MS usando una columna Aminex® HPX-87 (Bio-Rad, Hercules, California) y un Waters® TQ-Detector (Acquity® UPLC enlazado a un detector triple cuadrupolo, Waters, Milford, Massachusetts) y condiciones isocráticas con agua al 100 % como fase móvil.

Los títulos de poliol de todas las cepas evaluadas se representan en la Tabla 8.

Tabla 8

Producción de poliol de cepas de <i>P. ohmeri</i> SRLU transformadas con xilitol deshidrogenasa específica para NADH y NADPH de <i>P. stipitis</i> y/o D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD ⁺ de <i>E. coli</i> (promedio de triplicados)			
Cepa	Arabitol (g/L)	Xilitol (g/L)	Ribitol (g/L)
SRLU	32,9±2,4	nd	nd
EYS2943 [pEVE2839]	26,4±2,8	2,3±0,1	0,7±1,2
EYS2696 [pEVE2563]	36,0±2,7	nd.	0,8±0,1

Producción de poliol de cepas de *P. ohmeri* SRLU transformadas con xilitol deshidrogenasa específica para NADH y NADPH de *P. stipitis* y/o D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli* (promedio de triplicados)

Cepa	Arabitol (g/L)	Xilitol (g/L)	Ribitol (g/L)
EYS2697 [pEVE2564]	31,1±1,6	nd	6,3±0,1
EYS2962 [pEVE2839/pEVE2563]	29,6±0,8	7,0±0,3	2,3±0,1
EYS2755 [pEVE2839/pEVE2564]	16,4±2,2	19,9±0,8	10,9±0,4
nd - no detectado			

El uso de la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *P. stipitis* conduce a un aumento significativo en los títulos de xilitol, en comparación con la enzima específica para NADH natural.

Ejemplo 13. Expresión del gen de xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *Gluconobacter oxydans* plasmídico en *Pichia ohmeri*

Además de una cepa productora de xilitol que usa la xilitol deshidrogenasa específica para NADP de *P. stipitis*, se manipuló una segunda cepa que expresa la xilitol deshidrogenasa específica para NADP de *G. oxydans*.

La cepa de *P. ohmeri* SRLU (*MAT^h leu2 ura3*) derivada de ATCC 20209 y auxótrofa para leucina y uracilo (Piredda and Gaillardin, 1994, *supra*) se usó como hospedante para la construcción de una cepa de levadura que secreta xilitol mediante transformación con los plásmidos pEVE3157 (D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli*) y pEVE3284 (xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *G. oxydans*) que condujo a la cepa EYS3324.

Como testigo, también se generaron cepas transformadas con plásmidos simples:

- pEVE3157 (D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli*) y
- pEVE3284 (xilitol deshidrogenasa específica para NADH de *G. oxydans*) que conducen a EYS3067 y EYS3323, respectivamente.

La D-arabitol 4-oxidoreductasa de *E. coli* usada para la construcción de las cepas mencionadas anteriormente se controla mediante el promotor poPGK1 a diferencia del promotor poRR usado en las cepas que expresan la xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis*.

Sin embargo, para excluir una influencia del promotor y, por lo tanto, ser capaces de comparar los niveles de poliol en cepas que expresan la xilitol deshidrogenasa de *G. oxydans* con aquellas que expresan la enzima correspondiente de *P. stipitis*, se generó una cepa adicional.

Esta cepa EYS2963 se obtuvo mediante la transformación del hospedante SRLU con

- pEVE3123 (D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD⁺ de *E. coli*) y
- pEVE2564 (xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *P. stipitis*).

La transformación de la levadura se llevó a cabo según se describe en el Ejemplo 12. Cada cepa generada se evaluó por triplicado para determinar la producción de arabitol, xilitol y ribitol, según se describe en el Ejemplo 12.

Los títulos de poliol de todas las cepas evaluadas se representan en la Tabla 9.

Tabla 9

Producción de poliol de cepas de <i>P. ohmeri</i> SRLU transformadas con xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de <i>G. oxydans</i> y/o D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD ⁺ de <i>E. coli</i> (promedio de triplicados)			
Cepa	Arabitol (g/L)	Xilitol (g/L)	Ribitol (g/L)
SRLU	32,9±2,4	nd	nd

Producción de polirol de cepas de <i>P. ohmeri</i> SRLU transformadas con xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de <i>G. oxydans</i> y/o D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD ⁺ de <i>E. coli</i> (promedio de triplicados)			
<i>Cepa</i>	<i>Arabitol (g/L)</i>	<i>Xilitol (g/L)</i>	<i>Ribitol (g/L)</i>
EYS3067 [pEVE3157]	29,0±3,8	1,5±0,3	1,8±0,4
EYS3323 [pEVE3284]	32,8±0,6	nd	nd
EYS3324 [pEVE3157/pEVE3284]	26,3±1,7	21,1±1,1	1,2±0,1
EYS2963 [pEVE3123/pEVE2564]	27,3±2,5	17,7±1,7	13,9±0,7
<i>nd - no detectado</i>			

Los títulos de xilitol en cepas que expresan la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH de *G. oxydans* (EYS3324) son similares a los de las cepas que expresan la enzima correspondiente de *P. stipitis* (EYS2963). Sin embargo, la enzima de *G. oxydans* conduce a títulos de ribitol mucho más bajos, por lo tanto, exhibe una especificidad de sustrato más alta para xilulosa.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ROQUETTE FRERES

<120> PRODUCCIÓN DE XILITOL A PARTIR DE GLUCOSA MEDIANTE UNA CEPA RECOMBINANTE

<130> B1828EP

5 <160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 1385

< 212> ADN

10 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Secuencia que codifica D-arabitol 4-oxidoreductasa específica para NAD flanqueada por sitio de restricción

<220>

< 221> característica_diversa

15 < 222> (1)..(8)

< 223> sitio de reconocimiento de Ascl

<220>

< 221> CDS

< 222> (12)..(1379)

20 <220>

< 221> característica_diversa

< 222> (1380)..(1385)

< 223> sitio de reconocimiento de SphI

<400> 1

ggcgcgccaa a atg aac gag cag ttc acc tgg ttg cac atc ggt ttg ggt	50
Met Asn Glu Gln Phe Thr Trp Leu His Ile Gly Leu Gly	
1 5 10	

tct ttc cac aga gct cac cag gct tgg tac ttg cac aga ttg cag gtt	98
Ser Phe His Arg Ala His Gln Ala Trp Tyr Leu His Arg Leu Gln Val	
15 20 25	

atg ggt gac aag aga tgg tct atc gct gct ggt aac atc aga aac gac	146
Met Gly Asp Lys Arg Trp Ser Ile Ala Ala Gly Asn Ile Arg Asn Asp	
30 35 40 45	

gct gag cac gtt gtt cag gct ttg tct gct cag aag ggt aga tac gtt	194
Ala Glu His Val Val Gln Ala Leu Ser Ser Gln Lys Gly Arg Tyr Val	
50 55 60	

ttg gag acc gtt tct cca gag ggt gtt tct gag tac gag gag atc acc	242
Leu Glu Thr Val Ser Pro Glu Gly Val Ser Glu Tyr Glu Glu Ile Thr	
65 70 75	

tct atc cag aag ttg atc cca tgg cag gct gac ttg cag cca ttg atc	290
Ser Ile Gln Lys Leu Ile Pro Trp Gln Ala Asp Leu Gln Pro Leu Ile	
80 85 90	

gct gag ggt gct gac cca aag acc aag gtt atc gct ttc acc gtt acc	338
Ala Glu Gly Ala Asp Pro Lys Thr Lys Val Ile Ala Phe Thr Val Thr	

25

ES 2 673 865 T3

95	100	105	
gag ggt ggt tac tac ttg aac acc tct cac aag ttg gag gtt aac aac Glu Gly Gly Tyr Tyr Leu Asn Thr Ser His Lys Leu Glu Val Asn Asn 110 115 120 125			386
cca gac ttg gct gct gac ttg aag ggt ggt tgt aag acc atc tac ggt Pro Asp Leu Ala Ala Asp Leu Lys Gly Gly Cys Lys Thr Ile Tyr Gly 130 135 140			434
gtt atc acc aga atc ttg gag gct aga atg gct aac aac gct ggt cca Val Ile Thr Arg Ile Leu Glu Ala Arg Met Ala Asn Asn Ala Gly Pro 145 150 155			482
ttg acc ttg ttg aac tgt gac aac gtt aga cac aac ggt gag aga ttc Leu Thr Leu Leu Asn Cys Asp Asn Val Arg His Asn Gly Glu Arg Phe 160 165 170			530
cac gac ggt ttg gtt gag ttc ttg cag ttg acc ggt aag cag gac gtt His Asp Gly Leu Val Glu Phe Leu Gln Leu Thr Gly Lys Gln Asp Val 175 180 185			578
atc gac tgg ttg tct acc aac acc acc tgt cca aac acc atg gtt gac Ile Asp Trp Leu Ser Thr Asn Thr Thr Cys Pro Asn Thr Met Val Asp 190 195 200 205			626
aga atc acc cca aga cca gct gct gag ttg cca gct aga atc aag gct Arg Ile Thr Pro Arg Pro Ala Ala Glu Leu Pro Ala Arg Ile Lys Ala 210 215 220			674
cag acc ggt atc gct gac aag gct cca gtt atg ggt gag acc ttc atc Gln Thr Gly Ile Ala Asp Lys Ala Pro Val Met Gly Glu Thr Phe Ile 225 230 235			722
cag tgg gtt gtt gag gac aac ttc aga gac gtt aga cca gct ttg gag Gln Trp Val Val Glu Asp Asn Phe Arg Asp Val Arg Pro Ala Leu Glu 240 245 250			770
aag gtt ggt gtt gag ttg gtt gct tct gtt atc cca tac gag gag gct Lys Val Gly Val Glu Leu Val Ala Ser Val Ile Pro Tyr Glu Glu Ala 255 260 265			818
aag atc aga atc ttg aac tct tct cac tct tgt atc gct tgg gct ggt Lys Ile Arg Ile Leu Asn Ser Ser His Ser Cys Ile Ala Trp Ala Gly 270 275 280 285			866
acc ttg atc ggt cag aag tac atc cac gag tct acc atg acc gac ttc Thr Leu Ile Gly Gln Lys Tyr Ile His Glu Ser Thr Met Thr Asp Phe 290 295 300			914
atc tac cag atc gct gac aga tac gtt acc gag gac gtt atc cca tgt Ile Tyr Gln Ile Ala Asp Arg Tyr Val Thr Glu Asp Val Ile Pro Cys 305 310 315			962
ttg ggt gac aac ggt atc gac ttg cca acc tac aga gac gtt gtt ttg Leu Gly Asp Asn Gly Ile Asp Leu Pro Thr Tyr Arg Asp Val Val Leu 320 325 330			1010
aag aga ttc acc aac cca cac atc cag gac acc aac cag aga gtt gct Lys Arg Phe Thr Asn Pro His Ile Gln Asp Thr Asn Gln Arg Val Ala 335 340 345			1058
gct gac ggt ttc tct aag atc cca gct atg atc gct cca acc ttg aga			1106

ES 2 673 865 T3

Ala Asp Gly Phe Ser Lys Ile Pro Ala Met Ile Ala Pro Thr Leu Arg
 350 355 360 365

gag tgt tac cag aga ggt gtt aga cca aac gct acc gct atg ttg cca 1154
 Glu Cys Tyr Gln Arg Gly Val Arg Pro Asn Ala Thr Ala Met Leu Pro
 370 375 380

gct ttg ttc tac gtt ttc atg gag cag tgg cac cac ggt aag ttg cca 1202
 Ala Leu Phe Tyr Val Phe Met Glu Gln Trp His His Gly Lys Leu Pro
 385 390 395

tac gag tac cag gac ggt atc ttg gac gct cca gct gtt cac gct atg 1250
 Tyr Glu Tyr Gln Asp Gly Ile Leu Asp Ala Pro Ala Val His Ala Met
 400 405 410

ttg cag tct gct gac cca gtt gct gtt tac gct tct gac aag gct ttg 1298
 Leu Gln Ser Ala Asp Pro Val Ala Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ala Leu
 415 420 425

ttc ggt gac ttg acc gag aga gag gac ttc gct gct ttg ttg aga gag 1346
 Phe Gly Asp Leu Thr Glu Arg Glu Asp Phe Ala Ala Leu Leu Arg Glu
 430 435 440 445

aag atc gct gac gtt tac gct ttg atc aac taa gcatgc 1385
 Lys Ile Ala Asp Val Tyr Ala Leu Ile Asn
 450 455

<210> 2
 <211> 455
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 2
 Met Asn Glu Gln Phe Thr Trp Leu His Ile Gly Leu Gly Ser Phe His
 1 5 10 15

Arg Ala His Gln Ala Trp Tyr Leu His Arg Leu Gln Val Met Gly Asp
 20 25 30

Lys Arg Trp Ser Ile Ala Ala Gly Asn Ile Arg Asn Asp Ala Glu His
 35 40 45

Val Val Gln Ala Leu Ser Ala Gln Lys Gly Arg Tyr Val Leu Glu Thr
 50 55 60

Val Ser Pro Glu Gly Val Ser Glu Tyr Glu Glu Ile Thr Ser Ile Gln
 65 70 75 80

Lys Leu Ile Pro Trp Gln Ala Asp Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu Gly
 85 90 95

Ala Asp Pro Lys Thr Lys Val Ile Ala Phe Thr Val Thr Glu Gly Gly

ES 2 673 865 T3

100	105	110
Tyr Tyr Leu Asn Thr Ser His Lys Leu Glu Val Asn Asn Pro Asp Leu		
115	120	125
Ala Ala Asp Leu Lys Gly Gly Cys Lys Thr Ile Tyr Gly Val Ile Thr		
130	135	140
Arg Ile Leu Glu Ala Arg Met Ala Asn Asn Ala Gly Pro Leu Thr Leu		
145	150	155
Leu Asn Cys Asp Asn Val Arg His Asn Gly Glu Arg Phe His Asp Gly		
	165	170
Leu Val Glu Phe Leu Gln Leu Thr Gly Lys Gln Asp Val Ile Asp Trp		
	180	185
Leu Ser Thr Asn Thr Thr Cys Pro Asn Thr Met Val Asp Arg Ile Thr		
	195	200
Pro Arg Pro Ala Ala Glu Leu Pro Ala Arg Ile Lys Ala Gln Thr Gly		
	210	215
Ile Ala Asp Lys Ala Pro Val Met Gly Glu Thr Phe Ile Gln Trp Val		
225	230	235
Val Glu Asp Asn Phe Arg Asp Val Arg Pro Ala Leu Glu Lys Val Gly		
	245	250
Val Glu Leu Val Ala Ser Val Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Lys Ile Arg		
	260	265
Ile Leu Asn Ser Ser His Ser Cys Ile Ala Trp Ala Gly Thr Leu Ile		
	275	280
Gly Gln Lys Tyr Ile His Glu Ser Thr Met Thr Asp Phe Ile Tyr Gln		
	290	295
Ile Ala Asp Arg Tyr Val Thr Glu Asp Val Ile Pro Cys Leu Gly Asp		
305	310	315
Asn Gly Ile Asp Leu Pro Thr Tyr Arg Asp Val Val Leu Lys Arg Phe		
	325	330
Thr Asn Pro His Ile Gln Asp Thr Asn Gln Arg Val Ala Ala Asp Gly		
	340	345
		350

ES 2 673 865 T3

Phe Ser Lys Ile Pro Ala Met Ile Ala Pro Thr Leu Arg Glu Cys Tyr
355 360 365

Gln Arg Gly Val Arg Pro Asn Ala Thr Ala Met Leu Pro Ala Leu Phe
370 375 380

Tyr Val Phe Met Glu Gln Trp His His Gly Lys Leu Pro Tyr Glu Tyr
385 390 395 400

Gln Asp Gly Ile Leu Asp Ala Pro Ala Val His Ala Met Leu Gln Ser
405 410 415

Ala Asp Pro Val Ala Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ala Leu Phe Gly Asp
420 425 430

Leu Thr Glu Arg Glu Asp Phe Ala Ala Leu Leu Arg Glu Lys Ile Ala
435 440 445

Asp Val Tyr Ala Leu Ile Asn
450 455

<210> 3

<211> 1368

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia que codifica D-arabitol 4-oxidoreductasa especifica para NAD+

<400> 3

atgaacgagc agttcacctg gttgcacatc ggtttgggtt ctttccacag agctcaccag	60
gcttggtact tgcacagatt gcaggttatg ggtgacaaga gatggtctat cgctgctggt	120
aacatcagaa acgacgctga gcacggtgtt caggctttgt ctgctcagaa gggtagatac	180
gttttgaga ccgtttctcc agagggtgtt tctgagtacg aggagatcac ctctatccag	240
aagttgatcc catggcaggc tgacttgcag ccattgatcg ctgaggggtgc tgacccaaag	300
accaaggtta tcgctttcac cgttaccgag ggtggttact acttgaacac ctctcacaag	360
ttggaggtta acaaccaga cttggctgct gacttgaagg gtggttgtaa gaccatctac	420
ggtgttatca ccagaatctt ggaggctaga atggctaaca acgctggtcc attgacctg	480
ttgaactgtg acaacgtag acacaacggt gagagattcc acgacggttt ggttgagttc	540
ttgcagttga ccgtaagca ggacggtatc gactgggtgt ctaccaacac cacctgtcca	600
aacaccatgg ttgacagaat caccccaaga ccagctgctg agttgccagc tagaatcaag	660
gctcagaccg gtatcgctga caaggctcca gttatgggtg agaccttcac ccagtgggtt	720
gttgaggaca acttcagaga cgtagacca gctttggaga aggttggtgt tgagttggtt	780

gcttctgtta tcccatatga ggaggctaag atcagaatct tgaactcttc tcaactcttg 840
atcgcttggg ctggtacctt gatcggtcag aagtacatcc acgagtctac catgaccgac 900
ttcatctacc agatcgctga cagatacgtt accgaggacg ttatcccatg tttgggtgac 960
aacggtatcg acttgccaac ctacagagac gttgttttga agagattcac caaccacac 1020
atccaggaca ccaaccagag agttgctgct gacggtttct ctaagatccc agctatgac 1080
gctccaacct tgagagagtg ttaccagaga ggtgtagac caaacgctac cgctatgttg 1140
ccagctttgt tctacgtttt catggagcag tggcaccacg gtaagttgcc atacgagtac 1200
caggacggta tcttggaacg tccagctgtt cacgctatgt tgcagctctgc tgaccagtt 1260
gctgtttacg cttctgacaa ggctttgttc ggtgacttga ccgagagaga ggacttcgct 1320
gctttgttga gagagaagat cgctgacgtt tacgctttga tcaactaa 1368

<210> 4
<211> 1107
5 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH flanqueada por sitios de restricción

10 <220>
<221> característica_diversa
<222> (1)..(6)
<223> sitio de reconocimiento de HindIII

15 <220>
<221> CDS
<222> (10)..(1101)

<220>
<221> característica_diversa
<222> (1102)..(1107)
<223> sitio de reconocimiento de SacII

20 <400> 4
aagcttaaa atg act gct aac cct tcc ttg gtg ttg aac aag atc gac gac 51
Met Thr Ala Asn Pro Ser Leu Val Leu Asn Lys Ile Asp Asp
1 5 10
att tcg ttc gaa act tac gat gcc cca gaa atc tct gaa cct acc gat 99
Ile Ser Phe Glu Thr Tyr Asp Ala Pro Glu Ile Ser Glu Pro Thr Asp
15 20 25 30
gtc ctc gtc cag gtc aag aaa acc ggt atc tgt ggt tcc gac atc cac 147
Val Leu Val Gln Val Lys Lys Thr Gly Ile Cys Gly Ser Asp Ile His
35 40 45
ttc tac gcc cat ggt aga atc ggt aac ttc gtt ttg acc aag cca atg 195
Phe Tyr Ala His Gly Arg Ile Gly Asn Phe Val Leu Thr Lys Pro Met
50 55 60
gtc ttg ggt cac gaa tcc gcc ggt act gtt gtc cag gtt ggt aag ggt 243

ES 2 673 865 T3

Val	Leu	Gly	His	Glu	Ser	Ala	Gly	Thr	Val	Val	Gln	Val	Gly	Lys	Gly		
	65						70				75						
gtc	acc	tct	ctt	aag	ggt	ggt	gac	aac	gtc	gct	atc	gaa	cca	ggt	att	291	
Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Val	Gly	Asp	Asn	Val	Ala	Ile	Glu	Pro	Gly	Ile		
	80					85					90						
cca	tcc	aga	ttc	tcc	gac	gaa	tac	aag	agc	ggt	cac	tac	aac	ttg	tgt	339	
Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Asp	Glu	Tyr	Lys	Ser	Gly	His	Tyr	Asn	Leu	Cys		
	95				100					105					110		
cct	cac	atg	gcc	ttc	gcc	gct	act	cct	aac	tcc	aag	gaa	ggc	gaa	cca	387	
Pro	His	Met	Ala	Phe	Ala	Ala	Thr	Pro	Asn	Ser	Lys	Glu	Gly	Glu	Pro		
			115						120					125			
aac	cca	cca	ggt	acc	tta	tgt	aag	tac	ttc	aag	tcg	cca	gaa	gac	ttc	435	
Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Leu	Cys	Lys	Tyr	Phe	Lys	Ser	Pro	Glu	Asp	Phe		
			130				135						140				
ttg	gtc	aag	ttg	cca	gac	cac	gtc	agc	ttg	gaa	ctc	ggt	gct	ctt	ggt	483	
Leu	Val	Lys	Leu	Pro	Asp	His	Val	Ser	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Leu	Val		
	145					150						155					
gag	cca	ttg	tct	ggt	gtc	cac	gcc	tcc	aag	ttg	ggt	tcc	ggt	gct		531	
Glu	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Val	His	Ala	Ser	Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Ala		
	160				165					170							
ttc	ggc	gac	tac	ggt	gcc	gtc	ttt	ggt	gct	ggt	cct	ggt	ggt	ctt	ttg	579	
Phe	Gly	Asp	Tyr	Val	Ala	Val	Phe	Gly	Ala	Gly	Pro	Val	Gly	Leu	Leu		
	175				180				185						190		
gct	gct	gct	gtc	gcc	aag	acc	ttc	ggt	gct	aag	ggt	gtc	atc	gtc	ggt	627	
Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Lys	Thr	Phe	Gly	Ala	Lys	Gly	Val	Ile	Val	Val		
			195					200						205			
gct	aga	tca	gac	aga	aag	ttg	aag	atg	gcc	aag	gac	att	ggt	gct	gct	675	
Ala	Arg	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys	Met	Ala	Lys	Asp	Ile	Gly	Ala	Ala		
			210					215				220					
act	cac	acc	ttc	aac	tcc	aag	acc	ggt	ggt	tct	gaa	gaa	ttg	atc	aag	723	
Thr	His	Thr	Phe	Asn	Ser	Lys	Thr	Gly	Gly	Ser	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys		
			225				230					235					
gct	ttc	ggt	ggt	aac	gtg	cca	aac	gtc	ggt	ttg	gaa	tgt	act	ggt	gct	771	
Ala	Phe	Gly	Gly	Asn	Val	Pro	Asn	Val	Val	Leu	Glu	Cys	Thr	Gly	Ala		
	240				245						250						
gaa	cct	tgt	atc	aag	ttg	ggt	ggt	gac	gcc	att	gcc	cca	ggt	ggt	cgt	819	
Glu	Pro	Cys	Ile	Lys	Leu	Gly	Val	Asp	Ala	Ile	Ala	Pro	Gly	Gly	Arg		
	255				260				265						270		
ttc	ggt	caa	ggt	ggt	aac	gct	gct	ggt	cca	gtc	agc	ttc	cca	atc	acc	867	
Phe	Val	Gln	Val	Gly	Asn	Ala	Ala	Gly	Pro	Val	Ser	Phe	Pro	Ile	Thr		
			275					280						285			
ggt	ttc	gcc	atg	aag	gaa	ttg	act	ttg	ttc	ggt	tct	ttc	aga	tac	gga	915	
Val	Phe	Ala	Met	Lys	Glu	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ser	Phe	Arg	Tyr	Gly		
			290					295					300				
ttc	aac	gac	tac	aag	act	gct	ggt	gga	atc	ttt	gac	act	aac	tac	caa	963	
Phe	Asn	Asp	Tyr	Lys	Thr	Ala	Val	Gly	Ile	Phe	Asp	Thr	Asn	Tyr	Gln		
	305					310					315						
aac	ggt	aga	gaa	aat	gct	cca	att	gac	ttt	gaa	caa	ttg	atc	acc	cac	1011	
Asn	Gly	Arg	Glu	Asn	Ala	Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Gln	Leu	Ile	Thr	His		
	320				325						330						
aga	tac	aag	ttc	aag	gac	gct	att	gaa	gcc	tac	gac	ttg	gtc	aga	gcc	1059	
Arg	Tyr	Lys	Phe	Lys	Asp	Ala	Ile	Glu	Ala	Tyr	Asp	Leu	Val	Arg	Ala		
	335				340				345					350			
ggt	aag	ggt	gct	gtc	aag	tgt	ctc	att	gac	ggc	cct	gag	taa	ccgcgg		1107	
Gly	Lys	Gly	Ala	Val	Lys	Cys	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Glu					
			355					360									

<210> 5
 < 211> 363
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

5 <220>
 < 223> Construcción sintética

<400> 5
 Met Thr Ala Asn Pro Ser Leu Val Leu Asn Lys Ile Asp Asp Ile Ser
 1 5 10 15
 Phe Glu Thr Tyr Asp Ala Pro Glu Ile Ser Glu Pro Thr Asp Val Leu
 20 25 30
 Val Gln Val Lys Lys Thr Gly Ile Cys Gly Ser Asp Ile His Phe Tyr
 35 40 45
 Ala His Gly Arg Ile Gly Asn Phe Val Leu Thr Lys Pro Met Val Leu
 50 55 60
 Gly His Glu Ser Ala Gly Thr Val Val Gln Val Gly Lys Gly Val Thr
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Val Gly Asp Asn Val Ala Ile Glu Pro Gly Ile Pro Ser
 85 90 95
 Arg Phe Ser Asp Glu Tyr Lys Ser Gly His Tyr Asn Leu Cys Pro His
 100 105 110
 Met Ala Phe Ala Ala Thr Pro Asn Ser Lys Glu Gly Glu Pro Asn Pro
 115 120 125
 Pro Gly Thr Leu Cys Lys Tyr Phe Lys Ser Pro Glu Asp Phe Leu Val
 130 135 140
 Lys Leu Pro Asp His Val Ser Leu Glu Leu Gly Ala Leu Val Glu Pro
 145 150 155 160

ES 2 673 865 T3

Leu Ser Val Gly Val His Ala Ser Lys Leu Gly Ser Val Ala Phe Gly
165 170 175

Asp Tyr Val Ala Val Phe Gly Ala Gly Pro Val Gly Leu Leu Ala Ala
180 185 190

Ala Val Ala Lys Thr Phe Gly Ala Lys Gly Val Ile Val Val Ala Arg
195 200 205

Ser Asp Arg Lys Leu Lys Met Ala Lys Asp Ile Gly Ala Ala Thr His
210 215 220

Thr Phe Asn Ser Lys Thr Gly Gly Ser Glu Glu Leu Ile Lys Ala Phe
225 230 235 240

Gly Gly Asn Val Pro Asn Val Val Leu Glu Cys Thr Gly Ala Glu Pro
245 250 255

Cys Ile Lys Leu Gly Val Asp Ala Ile Ala Pro Gly Gly Arg Phe Val
260 265 270

Gln Val Gly Asn Ala Ala Gly Pro Val Ser Phe Pro Ile Thr Val Phe
275 280 285

Ala Met Lys Glu Leu Thr Leu Phe Gly Ser Phe Arg Tyr Gly Phe Asn
290 295 300

Asp Tyr Lys Thr Ala Val Gly Ile Phe Asp Thr Asn Tyr Gln Asn Gly
305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Pro Ile Asp Phe Glu Gln Leu Ile Thr His Arg Tyr
325 330 335

Lys Phe Lys Asp Ala Ile Glu Ala Tyr Asp Leu Val Arg Ala Gly Lys
340 345 350

Gly Ala Val Lys Cys Leu Ile Asp Gly Pro Glu
355 360

<210> 6

< 211> 1092

5 < 212> ADN

< 213> secuencia artificial

<220>

< 223> secuencia que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH

<400> 6

10 atgactgcta acccttcctt ggtgttgaac aagatcgacg acatttcggt cgaaacttac

60

ES 2 673 865 T3

```

gatgccccag aaatctctga acctaccgat gtccctcgcc aggtcaagaa aaccggtatc 120
tgtggttccg acatccactt ctacgcccac ggtagaatcg gtaacttcgt tttgaccaag 180
ccaatggtct tgggtcacga atccgcccgt actgttgtcc aggttggtaa ggggtgtcac 240
tctcttaagg ttggtgacaa cgctcgctatc gaaccaggta ttccatccag attctccgac 300
gaatacaaga gcggtcacta caacttgtgt cctcacatgg ccttcgcccgc tactcctaac 360
tccaaggaag gcgaacccaa cccaccaggt accttatgta agtacttcaa gtcgccagaa 420
gacttcttgg tcaagttgcc agaccacgtc agcttggaa tcggtgctct tgttgagcca 480
ttgtctgttg gtgtccacgc ctccaagttg ggttccggtt ctttcggcga ctacgttgcc 540
gtctttggtg ctggtcctgt tggctctttg gctgctgctg tcgccaaagac cttcggtgct 600
aagggtgtca tcgtcggtgc tagatcagac agaaagttga agatggccaa ggacattggt 660
gctgctactc acaccttcaa ctccaagacc ggtggttctg aagaattgat caaggctttc 720
ggtggtaacg tgccaaacgt cgttttggaa tgtactggtg ctgaaccttg tatcaagttg 780
ggtgttgacg ccattgcccc aggtggtcgt ttcgttcaag ttggtaacgc tgctggtcca 840
gtcagcttcc caatcacctg tttcgccatg aaggaattga ctttggttcg ttctttcaga 900
tacggattca acgactacaa gactgctgtt ggaatctttg aactaacta ccaaaacggt 960
agagaaaatg ctccaattga ctttgaacaa ttgatcacc acagatacaa gttcaaggac 1020
gctattgaag cctacgactt ggtcagagcc ggtaagggtg ctgtcaagtg tctcattgac 1080
ggccctgagt aa 1092

```

<210> 7

<211> 806

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH flanqueada por sitio de restricción

<220>

10 <221> característica_diversa

<222> (1)..(8)

<223> sitio de reconocimiento de Acl

<220>

<221> CDS

15 <222> (12)..(800)

<220>

<221> característica_diversa

<222> (801)..(806)

<223> sitio de reconocimiento de SphI

20 <400> 7

```

ggcgcgccaa a atg tct aag aag ttc aac ggt aag gtt tgt ttg gtt acc 50

```

ES 2 673 865 T3

Met	Ser	Lys	Lys	Phe	Asn	Gly	Lys	Val	Cys	Leu	Val	Thr				
1				5				10								
ggt	gct	ggt	ggt	aac	atc	ggt	ttg	gct	acc	gct	ttg	aga	ttg	gct	gag	98
Gly	Ala	Gly	Gly	Asn	Ile	Gly	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Glu	
15						20					25					
gag	ggt	acc	gct	atc	gct	ttg	ttg	tct	aga	aac	aga	gag	gct	ttg	gag	146
Glu	Gly	Thr	Ala	Ile	Ala	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	
30					35					40					45	
aag	gct	gag	gct	tct	ggt	aga	gag	aag	ggt	ggt	gag	gct	aga	tct	tac	194
Lys	Ala	Glu	Ala	Ser	Val	Arg	Glu	Lys	Gly	Val	Glu	Ala	Arg	Ser	Tyr	
				50					55					60		
ggt	tgt	gac	ggt	acc	tct	gag	gag	gct	ggt	atc	ggt	acc	ggt	gac	tct	242
Val	Cys	Asp	Val	Thr	Ser	Glu	Glu	Ala	Val	Ile	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	
			65					70					75			
ggt	ggt	aga	gac	ttc	ggt	aag	atc	gac	ttc	ttg	ttc	aac	aac	gct	ggt	290
Val	Val	Arg	Asp	Phe	Gly	Lys	Ile	Asp	Phe	Leu	Phe	Asn	Asn	Ala	Gly	
		80					85					90				
tac	cag	ggt	gct	ttc	gct	cca	ggt	cag	gac	tac	cca	tct	gac	gac	ttc	338
Tyr	Gln	Gly	Ala	Phe	Ala	Pro	Val	Gln	Asp	Tyr	Pro	Ser	Asp	Asp	Phe	
95						100					105					
gct	aga	ggt	ttg	acc	atc	aac	ggt	acc	ggt	gct	ttc	cac	ggt	ttg	aag	386
Ala	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Asn	Val	Thr	Gly	Ala	Phe	His	Val	Leu	Lys	
110					115					120					125	
gct	ggt	tct	aga	cag	atg	atc	acc	cag	aac	tac	ggt	aga	atc	ggt	aac	434
Ala	Val	Ser	Arg	Gln	Met	Ile	Thr	Gln	Asn	Tyr	Gly	Arg	Ile	Val	Asn	
				130					135					140		
acc	gct	tct	atg	gct	ggt	ggt	aag	ggt	cca	cca	aac	atg	gct	gct	tac	482
Thr	Ala	Ser	Met	Ala	Gly	Val	Lys	Gly	Pro	Pro	Asn	Met	Ala	Ala	Tyr	
			145					150					155			
ggt	acc	tct	aag	ggt	gct	atc	atc	gct	ttg	acc	gag	acc	gct	gct	ttg	530
Gly	Thr	Ser	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Leu	
		160					165					170				
gac	ttg	gct	cca	tac	aac	atc	aga	ggt	aac	gct	atc	tct	cca	ggt	tac	578
Asp	Leu	Ala	Pro	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Ser	Pro	Gly	Tyr	
	175					180					185					
atg	ggt	cca	ggt	ttc	atg	tgg	gag	aga	cag	ggt	gag	ttg	cag	gct	aag	626
Met	Gly	Pro	Gly	Phe	Met	Trp	Glu	Arg	Gln	Val	Glu	Leu	Gln	Ala	Lys	
190					195					200					205	
ggt	ggt	tct	cag	tac	ttc	tct	acc	gac	cca	aag	ggt	ggt	gct	cag	cag	674
Val	Gly	Ser	Gln	Tyr	Phe	Ser	Thr	Asp	Pro	Lys	Val	Val	Ala	Gln	Gln	
			210						215					220		
atg	atc	ggt	tct	ggt	cca	atg	aga	aga	tac	ggt	gac	atc	aac	gag	atc	722
Met	Ile	Gly	Ser	Val	Pro	Met	Arg	Arg	Tyr	Gly	Asp	Ile	Asn	Glu	Ile	
			225					230					235			
cca	ggt	ggt	ggt	gct	ttc	ttg	ttg	ggt	gac	gac	tct	tct	ttc	atg	acc	770
Pro	Gly	Val	Val	Ala	Phe	Leu	Leu	Gly	Asp	Asp	Ser	Ser	Phe	Met	Thr	
		240					245					250				
ggt	ggt	aac	ttg	cca	atc	gct	ggt	ggt	tga	gcatgc						806
Gly	Val	Asn	Leu	Pro	Ile	Ala	Gly	Gly								
		255				260										

<210> 8
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

< 223> Construcción sintética

<400> 8

Met Ser Lys Lys Phe Asn Gly Lys Val Cys Leu Val Thr Gly Ala Gly
1 5 10 15

Gly Asn Ile Gly Leu Ala Thr Ala Leu Arg Leu Ala Glu Glu Gly Thr
20 25 30

Ala Ile Ala Leu Leu Ser Arg Asn Arg Glu Ala Leu Glu Lys Ala Glu
35 40 45

Ala Ser Val Arg Glu Lys Gly Val Glu Ala Arg Ser Tyr Val Cys Asp
50 55 60

Val Thr Ser Glu Glu Ala Val Ile Gly Thr Val Asp Ser Val Val Arg
65 70 75 80

Asp Phe Gly Lys Ile Asp Phe Leu Phe Asn Asn Ala Gly Tyr Gln Gly
85 90 95

Ala Phe Ala Pro Val Gln Asp Tyr Pro Ser Asp Asp Phe Ala Arg Val
100 105 110

Leu Thr Ile Asn Val Thr Gly Ala Phe His Val Leu Lys Ala Val Ser
115 120 125

Arg Gln Met Ile Thr Gln Asn Tyr Gly Arg Ile Val Asn Thr Ala Ser
130 135 140

Met Ala Gly Val Lys Gly Pro Pro Asn Met Ala Ala Tyr Gly Thr Ser
145 150 155 160

Lys Gly Ala Ile Ile Ala Leu Thr Glu Thr Ala Ala Leu Asp Leu Ala
165 170 175

Pro Tyr Asn Ile Arg Val Asn Ala Ile Ser Pro Gly Tyr Met Gly Pro
180 185 190

Gly Phe Met Trp Glu Arg Gln Val Glu Leu Gln Ala Lys Val Gly Ser
195 200 205

Gln Tyr Phe Ser Thr Asp Pro Lys Val Val Ala Gln Gln Met Ile Gly
210 215 220

Ser Val Pro Met Arg Arg Tyr Gly Asp Ile Asn Glu Ile Pro Gly Val
225 230 235 240

Val Ala Phe Leu Leu Gly Asp Asp Ser Ser Phe Met Thr Gly Val Asn
245 250 255

Leu Pro Ile Ala Gly Gly
260

5

<210> 9
 < 211> 789
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

5 <220>
 < 223> secuencia que codifica xilitol deshidrogenasa específica para NADPH

<400> 9
 atgtctaaga agttcaacgg taaggtttgt ttggttaccg gtgctggtgg taacatcggt 60
 ttggctaccg ctttgagatt ggctgaggag ggtaccgcta tcgctttgtt gtctagaaac 120
 agagaggcctt tggagaaggc tgaggcttct gttagagaga aggggtgttg ggctagatct 180
 tacgtttgtg acgttacctc tgaggaggct gttatcggtt ccgttgactc tgttggtaga 240
 gacttcggta agatcgactt cttgttcaac aacgctgggt accagggtgc ttctgctcca 300
 gttcaggact acccatctga cgacttcgct agagttttga ccatcaacgt taccggtgct 360
 ttccacgttt tgaaggctgt ttctagacag atgatcacc agaactacgg tagaatcggt 420
 aacaccgctt ctatggctgg tggttaagggt ccaccaaaca tggttgctta cggtagctct 480
 aagggtgcta tcatcgcttt gaccgagacc gctgctttgg acttggctcc atacaacatc 540
 agagttaacg ctatctctcc aggttacatg ggtccagggt tcatgtggga gagacagggt 600
 gagttgcagg ctaagggttg ttctcagtag ttctctaccg acccaaaggt tgttgctcag 660
 cagatgatcg gttctgttcc aatgagaaga tacggtgaca tcaacgagat ccaggtggt 720
 gttgctttct tgttgggtga cgactcttct ttcatgaccg gtgttaactt gccaatcgct 780
 ggtggttga 789

10 <210> 10
 < 211> 873
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> secuencia que codifica tagatosa-3-epimerasa

15 <220>
 < 221> CDS
 < 222> (1)..(873)

ES 2 673 865 T3

<400> 10

atg aac aaa gtt ggc atg ttc tac acc tac tgg tgc act gag tgg atg	48
Met Asn Lys Val Gly Met Phe Tyr Thr Tyr Trp Ser Thr Glu Trp Met	
1 5 10 15	
gtc gac ttt ccg gcg act gcg aag cgc att gcc ggg ctc ggc ttc gac	96
Val Asp Phe Pro Ala Thr Ala Lys Arg Ile Ala Gly Leu Gly Phe Asp	
20 25 30	
tta atg gaa atc tgc ctc ggc gag ttt cac aat ctt tcc gac gcg aag	144
Leu Met Glu Ile Ser Leu Gly Glu Phe His Asn Leu Ser Asp Ala Lys	
35 40 45	
aag cgt gag cta aaa gcc gtg gct gat gat ctg ggg ctc acg gtg atg	192
Lys Arg Glu Leu Lys Ala Val Ala Asp Asp Leu Gly Leu Thr Val Met	
50 55 60	
tgc tgt atc gga ctg aag tct gag tac gac ttt gcc tgc ccg gac aag	240
Cys Cys Ile Gly Leu Lys Ser Glu Tyr Asp Phe Ala Ser Pro Asp Lys	
65 70 75 80	
agc gtt cgt gat gcc ggc acg gaa tat gtg aag cgc ttg ctc gac gac	288
Ser Val Arg Asp Ala Gly Thr Glu Tyr Val Lys Arg Leu Leu Asp Asp	
85 90 95	
tgt cac ctc ctc ggt gcg ccg gtc ttt gct ggc ctt acg ttc tgc gcg	336
Cys His Leu Leu Gly Ala Pro Val Phe Ala Gly Leu Thr Phe Cys Ala	
100 105 110	
tgg ccc caa tct ccg ccg ctg gac atg aag gat aag cgc cct tac gtc	384
Trp Pro Gln Ser Pro Pro Leu Asp Met Lys Asp Lys Arg Pro Tyr Val	
115 120 125	
gac cgt gca atc gaa agc gtt cgt cgt gtt atc aag gta gct gaa gac	432
Asp Arg Ala Ile Glu Ser Val Arg Arg Val Ile Lys Val Ala Glu Asp	
130 135 140	
tac ggc att att tat gca ctg gaa gtg gtg aac cga ttc gag cag tgg	480
Tyr Gly Ile Ile Tyr Ala Leu Glu Val Val Asn Arg Phe Glu Gln Trp	
145 150 155 160	
ctt tgc aat gac gcc aag gaa gca att gcg ttt gcc gac gcg gtt gac	528
Leu Cys Asn Asp Ala Lys Glu Ala Ile Ala Phe Ala Asp Ala Val Asp	
165 170 175	
agt ccg gcg tgc aag gtc cag ctc gac aca ttc cac atg aat atc gaa	576
Ser Pro Ala Cys Lys Val Gln Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu	
180 185 190	
gag act tcc ttc cgc gat gca atc ctt gcc tgc aag ggc aag atg ggc	624
Glu Thr Ser Phe Arg Asp Ala Ile Leu Ala Cys Lys Gly Lys Met Gly	
195 200 205	
cat ttc cat ttg ggc gaa gcg aac cgt ctg ccg ccg ggc gag ggt cgc	672
His Phe His Leu Gly Glu Ala Asn Arg Leu Pro Pro Gly Glu Gly Arg	

ES 2 673 865 T3

210	215	220	
ctg ccg tgg gat gaa ata ttc ggg gcg ctg aag gaa atc gga tat gac			720
Leu Pro Trp Asp Glu Ile Phe Gly Ala Leu Lys Glu Ile Gly Tyr Asp			
225	230	235	240
ggc acc atc gtt atg gaa ccg ttc atg cgc aag ggc ggc tcg gtc agc			768
Gly Thr Ile Val Met Glu Pro Phe Met Arg Lys Gly Gly Ser Val Ser			
	245	250	255
cgc gcg gtg ggc gta tgg cgg gat atg tcg aac ggt gcg acg gac gaa			816
Arg Ala Val Gly Val Trp Arg Asp Met Ser Asn Gly Ala Thr Asp Glu			
	260	265	270
gag atg gac gag cgc gct cgc cgc tcg ttg cag ttt gtt cgt gac aag			864
Glu Met Asp Glu Arg Ala Arg Arg Ser Leu Gln Phe Val Arg Asp Lys			
	275	280	285
ctg gcc tga			873
Leu Ala			
290			

<210> 11
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 11
 Met Asn Lys Val Gly Met Phe Tyr Thr Tyr Trp Ser Thr Glu Trp Met
 1 5 10 15

Val Asp Phe Pro Ala Thr Ala Lys Arg Ile Ala Gly Leu Gly Phe Asp
 20 25 30

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

Lys Arg Glu Leu Lys Ala Val Ala Asp Asp Leu Gly Leu Thr Val Met
 50 55 60

Cys Cys Ile Gly Leu Lys Ser Glu Tyr Asp Phe Ala Ser Pro Asp Lys
 65 70 75 80

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

Cys His Leu Leu Gly Ala Pro Val Phe Ala Gly Leu Thr Phe Cys Ala
 100 105 110

Trp Pro Gln Ser Pro Pro Leu Asp Met Lys Asp Lys Arg Pro Tyr Val
 115 120 125

ES 2 673 865 T3

Asp Arg Ala Ile Glu Ser Val Arg Arg Val Ile Lys Val Ala Glu Asp
130 135 140

Tyr Gly Ile Ile Tyr Ala Leu Glu Val Val Asn Arg Phe Glu Gln Trp
145 150 155 160

Leu Cys Asn Asp Ala Lys Glu Ala Ile Ala Phe Ala Asp Ala Val Asp
165 170 175

Ser Pro Ala Cys Lys Val Gln Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu
180 185 190

Glu Thr Ser Phe Arg Asp Ala Ile Leu Ala Cys Lys Gly Lys Met Gly
195 200 205

His Phe His Leu Gly Glu Ala Asn Arg Leu Pro Pro Gly Glu Gly Arg
210 215 220

Leu Pro Trp Asp Glu Ile Phe Gly Ala Leu Lys Glu Ile Gly Tyr Asp
225 230 235 240

Gly Thr Ile Val Met Glu Pro Phe Met Arg Lys Gly Gly Ser Val Ser
245 250 255

Arg Ala Val Gly Val Trp Arg Asp Met Ser Asn Gly Ala Thr Asp Glu
260 265 270

Glu Met Asp Glu Arg Ala Arg Arg Ser Leu Gln Phe Val Arg Asp Lys
275 280 285

Leu Ala
290

<210> 12
<211> 26
5 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 12
gaactagtgg atccgtagaa atcttg 26

<210> 13
<211> 44
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 13
ctttgtcat ttggcgcg ctttagttt aataagggtc cgtg 44

<210> 14
 < 211> 38
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

5 <220>
 < 223> cebador

<400> 14
 aaactaaaag gcgcgcaaa atgaacaaag ttggcatg 38

10 <210> 15
 < 211> 36
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> cebador

15 <400> 15
 ttctcttga gagcatgctc aggccagctt gtcacg 36

<210> 16
 < 211> 35
 < 212> ADN
 20 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> cebador

<400> 16
 aagctggcct gagcatgctc tcgaagagaa tctag 35

25 <210> 17
 < 211> 26
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

<220>
 30 < 223> cebador

<400> 17
 gttccgcgga gaatgacacg gccgac 26

<210> 18
 < 211> 31
 < 212> ADN
 35 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> cebador

<400> 18
 40 aaggcgcgcc aaaatgactg ctaacccttc c 31

<210> 19
 < 211> 27
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> cebador

<400> 19
 gagcatgctt actcagggcc gtcaatg 27

5 <210> 20
 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

10 <220>
 < 223> cebador

<400> 20
 gaagactagt tcacgtgatc tc 22

15 <210> 21
 < 211> 30
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> cebador

20 <400> 21
 cactggcgcg ccttttgtgt ggtggtgtcc 30

<210> 22
 < 211> 33
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

25 <220>
 < 223> cebador

<400> 22
 tagcagcatg cataggttag tgaatgaggt atg 33

30 <210> 23
 < 211> 28
 < 212> ADN
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> cebador

35 <400>23
 taggtccgcg ggagcttcgt taaagggc 28

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedante recombinante capaz de producir xilitol, en donde dicha célula hospedante comprende:
una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica una D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) que usa D-arabitol como sustrato y que produce D-xilulosa como producto; y
- 5 una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica una xilitol deshidrogenasa específica para NADPH que usa D-xilulosa como sustrato y que produce xilitol como producto,
en donde la célula hospedante produce D-arabitol a partir de D-glucosa, en particular en medio a presión osmótica elevada y no consume D-arabitol como única fuente de carbono.
- 10 2. La célula hospedante recombinante según la reivindicación 1, en donde la célula hospedante se selecciona de bacterias, hongos y levadura.
3. La célula hospedante recombinante según la reivindicación 2, en donde la célula hospedante es una levadura osmófila u osmotolerante.
4. La célula hospedante recombinante según la reivindicación 2, en donde la célula hospedante es *Pichia ohmeri*.
- 15 5. La célula hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) es de *E. coli*.
6. La célula hospedante recombinante según la reivindicación 5, en donde la D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) comprende o consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident. 2 o una secuencia con 1-3 adiciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos.
- 20 7. La célula hospedante recombinante según la reivindicación 6, en donde la secuencia que codifica la D-arabitol 4-oxidorreductasa específica para NAD⁺ (EC 1.1.1.11) comprende o consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident. 3.
8. La célula hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH es una xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis* o *Gluconobacter oxydans* mutada para cambiar la especificidad para el cofactor de NADH a NADPH.
- 25 9. La célula hospedante recombinante según la reivindicación 8, en donde la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH comprende o consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident. 5 u 8 o una secuencia con 1-3 adiciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos.
10. La célula hospedante recombinante según la reivindicación 9, en donde la secuencia que codifica la xilitol deshidrogenasa específica para NADPH comprende o consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident. 6 o 9.
- 30 11. La célula hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la célula hospedante es capaz de producir un título de xilitol de al menos 15 g/l en el sobrenadante después de un cultivo de 48 horas.
12. Un método para producir xilitol que comprende cultivar una célula hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y recuperar xilitol.
- 35 13. Uso de una célula hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para producir xilitol.

FIGURA 1

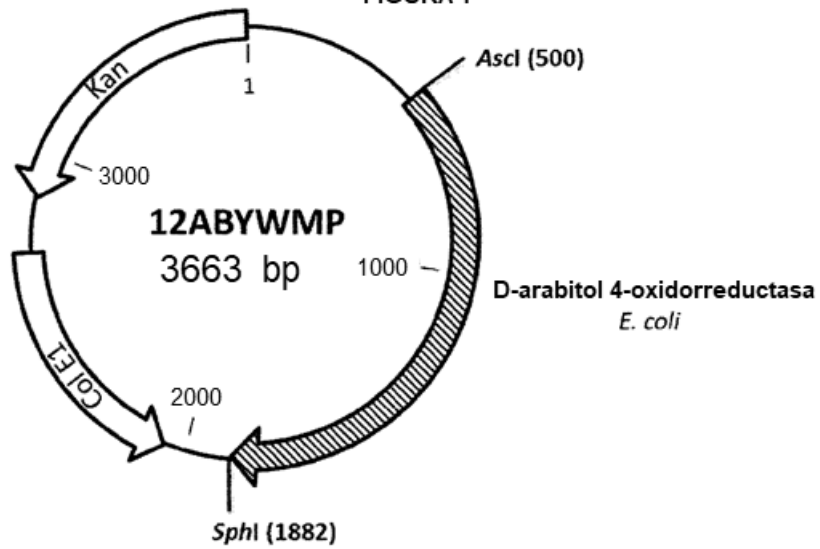
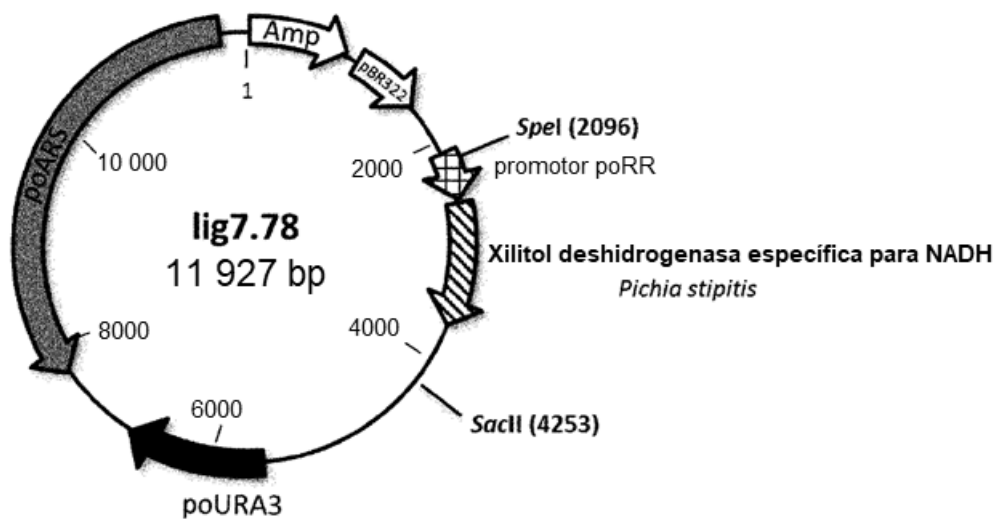


FIGURA 2a



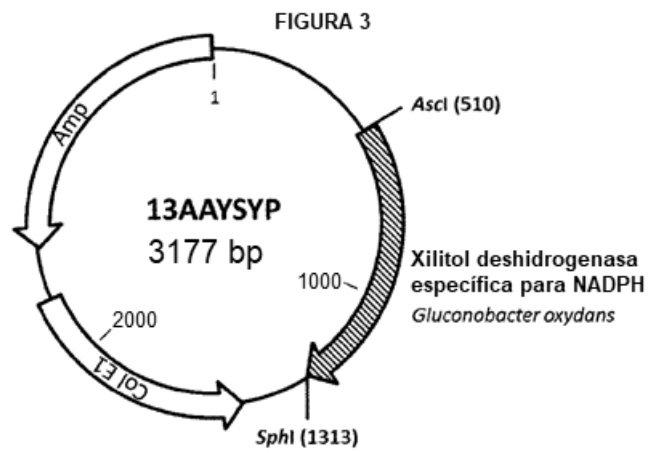
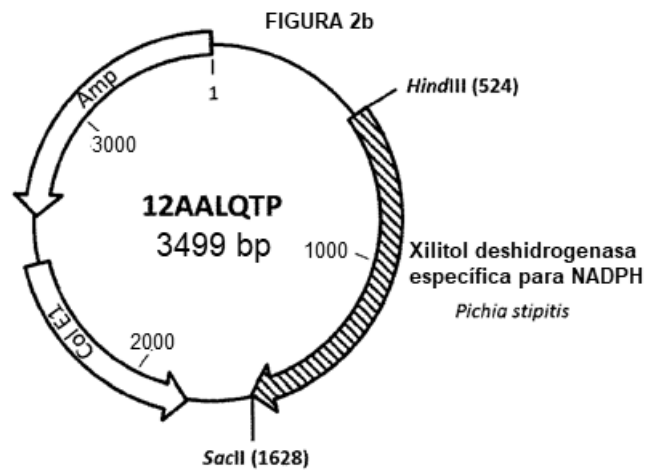


FIGURA 4

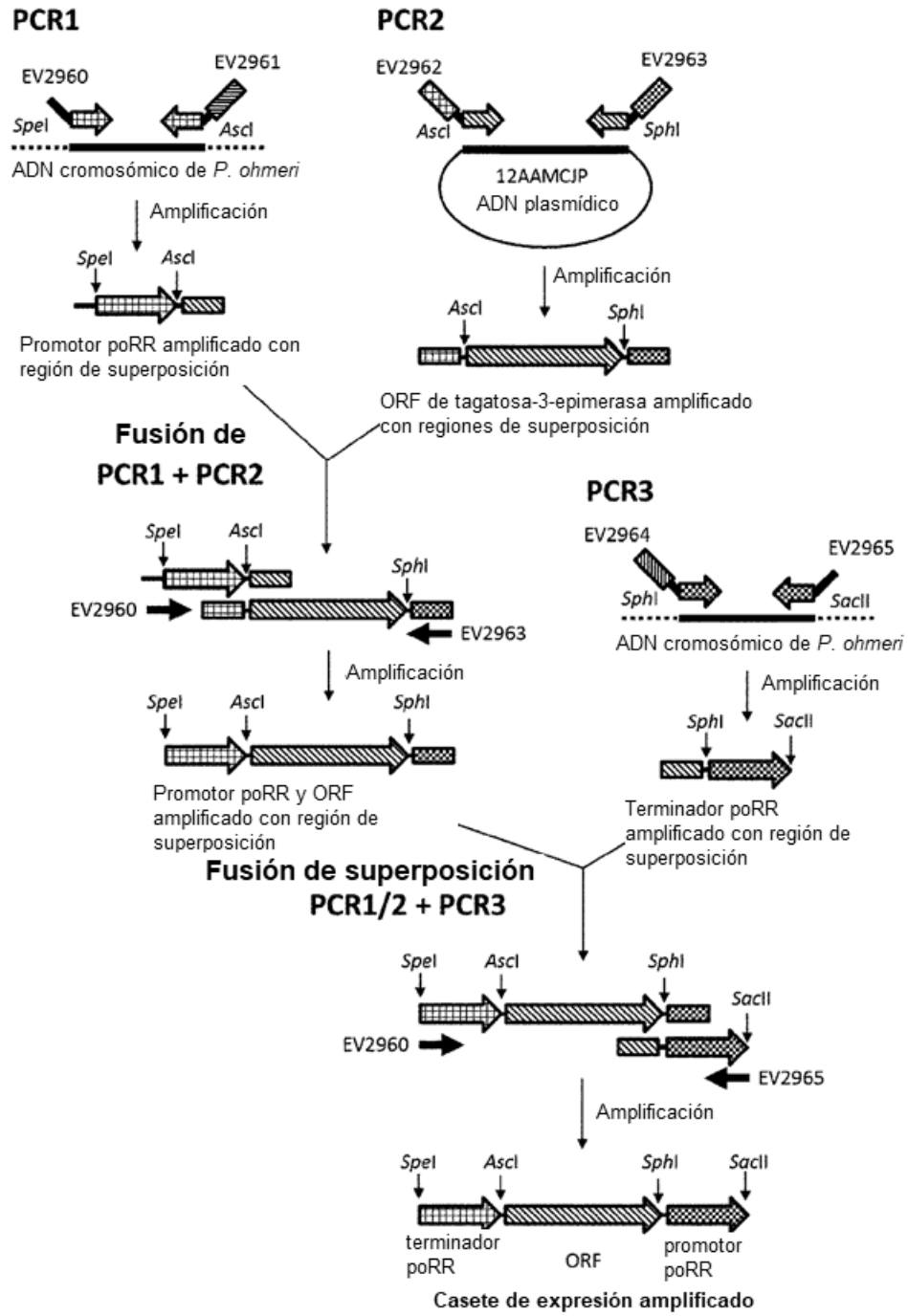


FIGURA 5

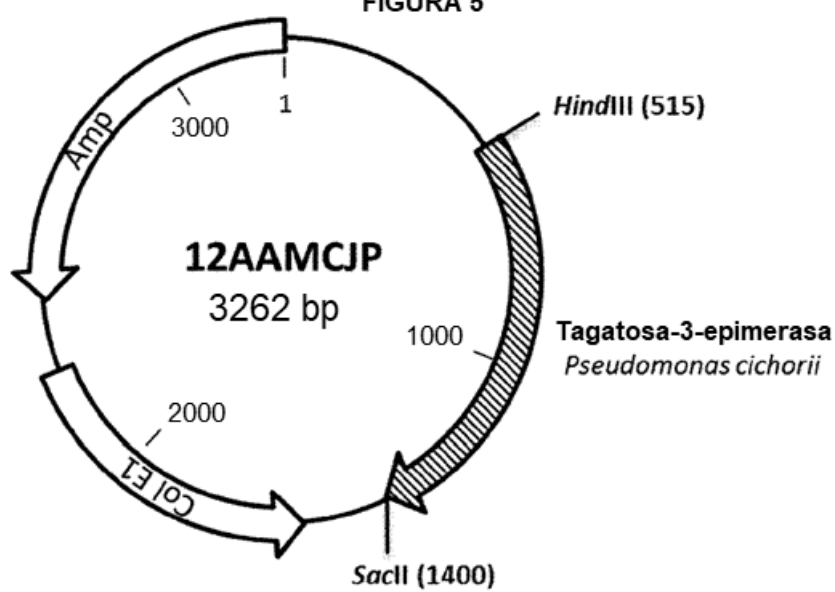


FIGURA 6

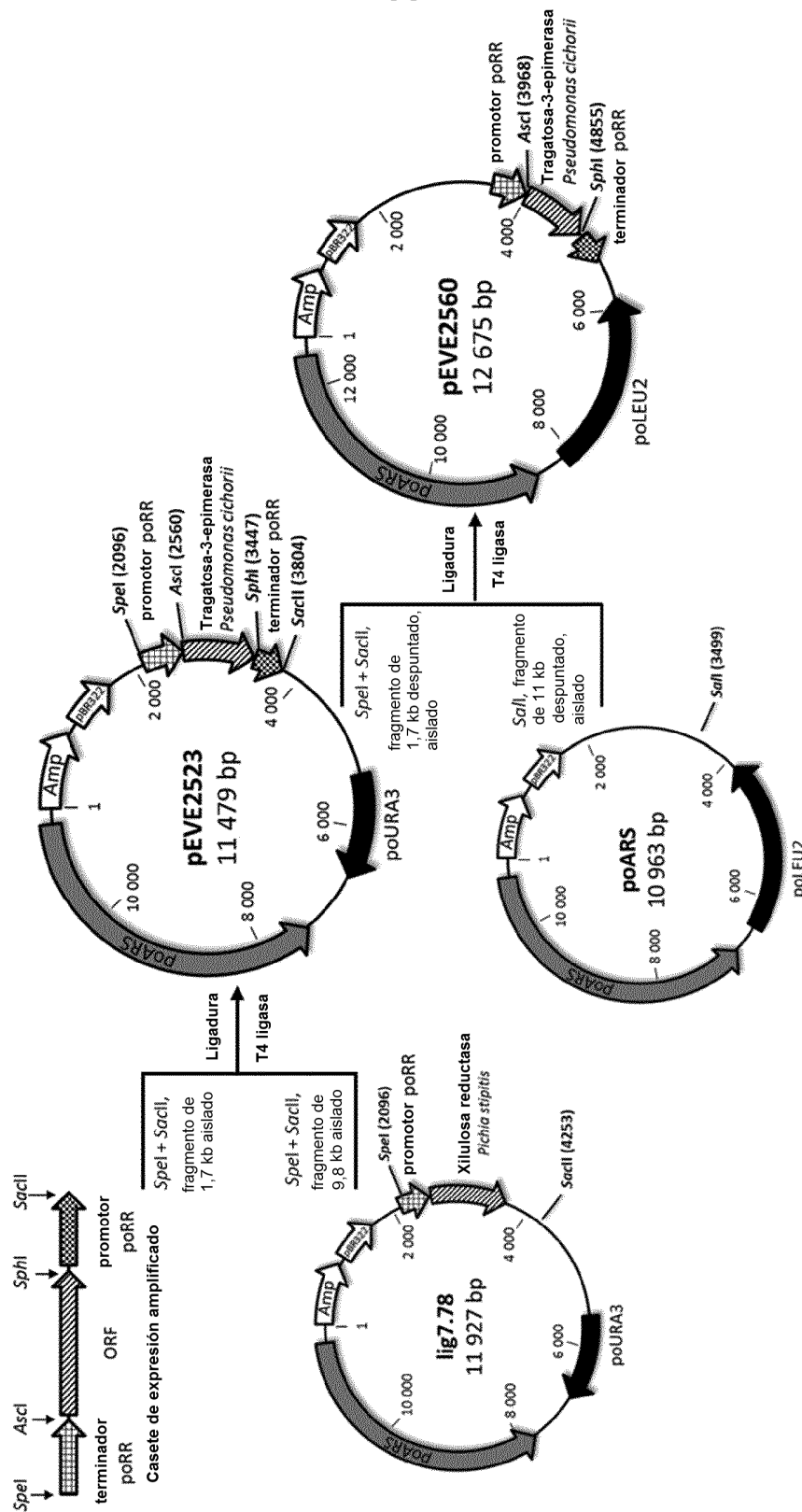


FIGURA 7

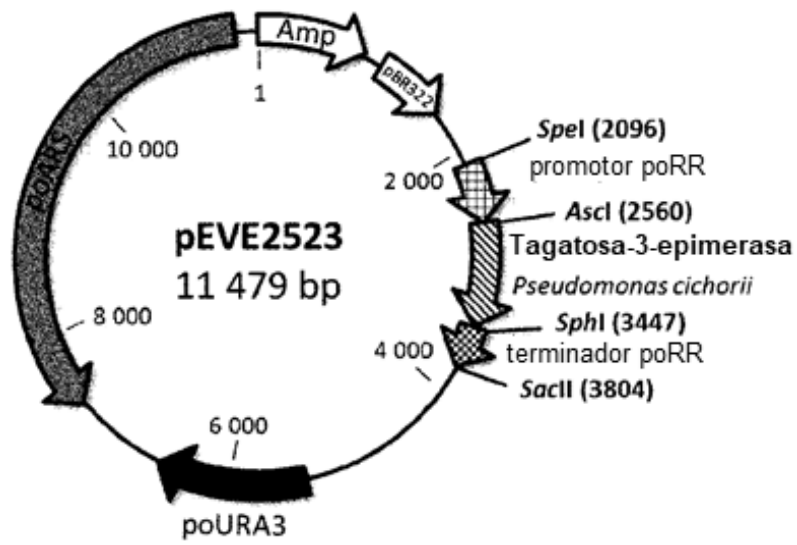


FIGURA 8

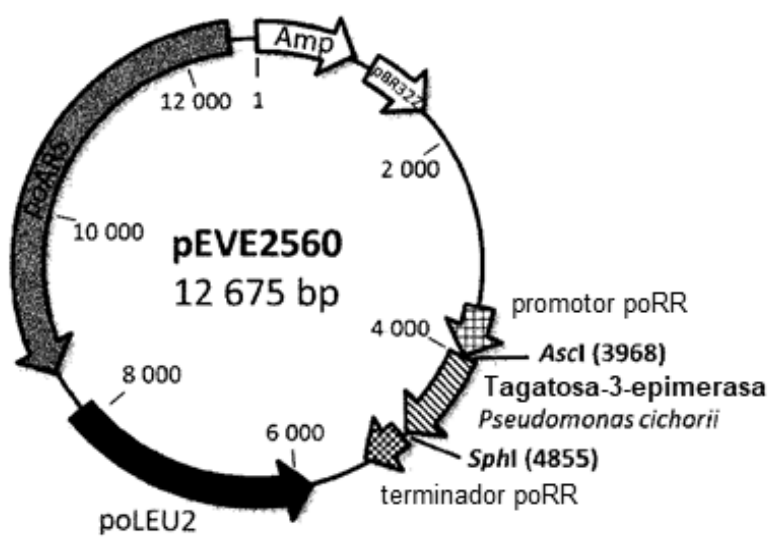


FIGURA 9

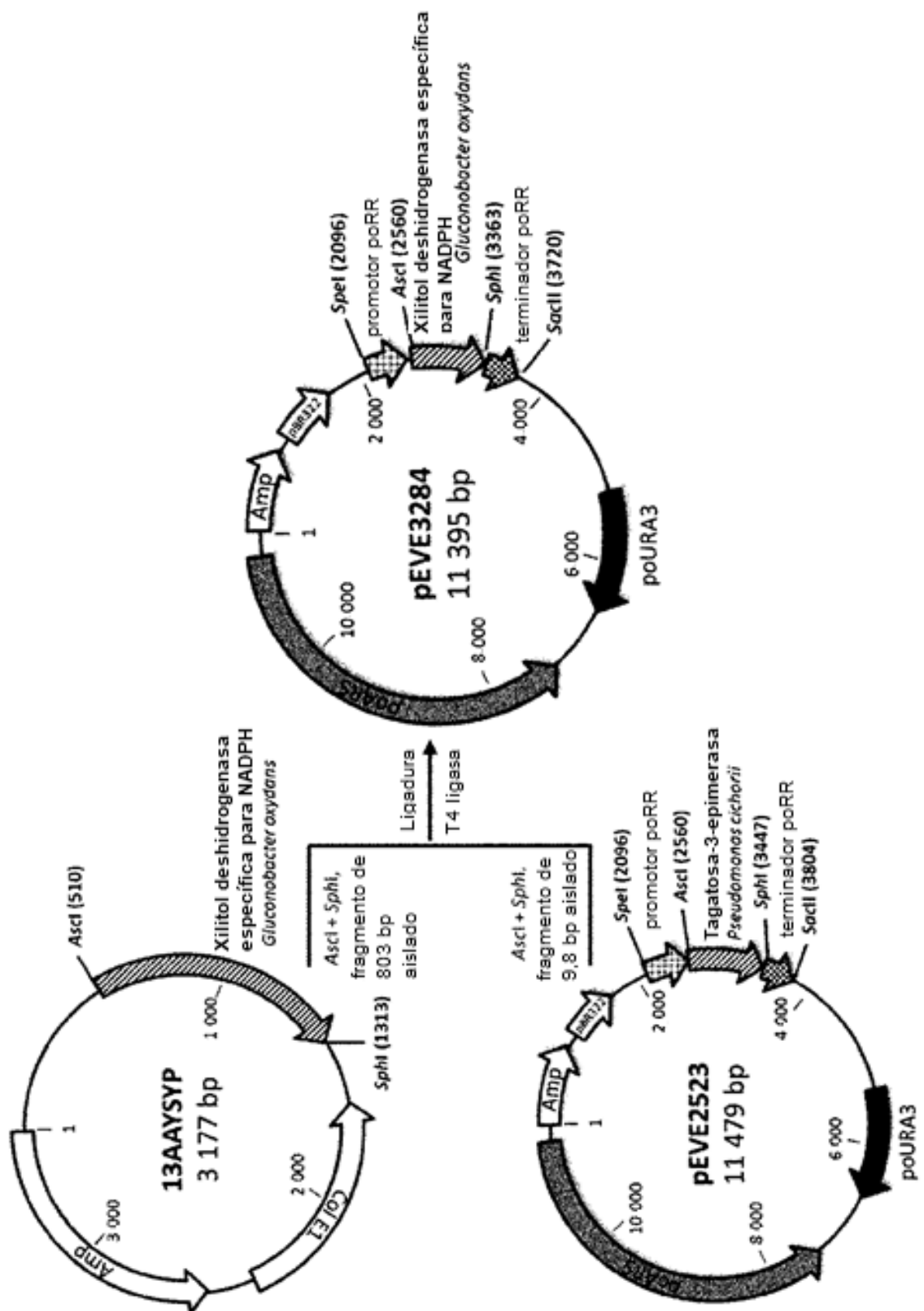


FIGURA 10

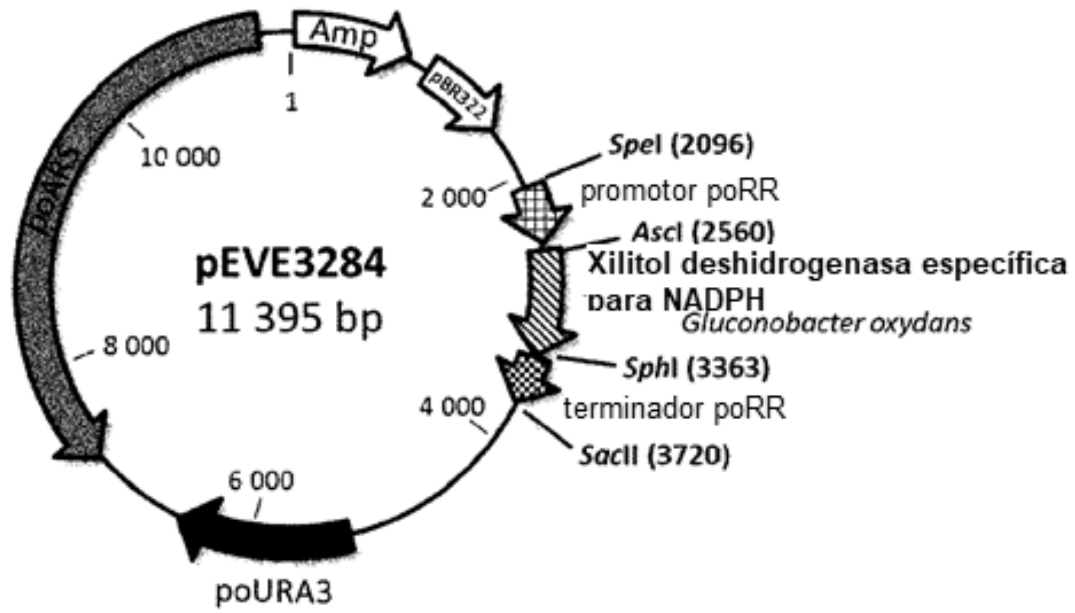


FIGURA 11

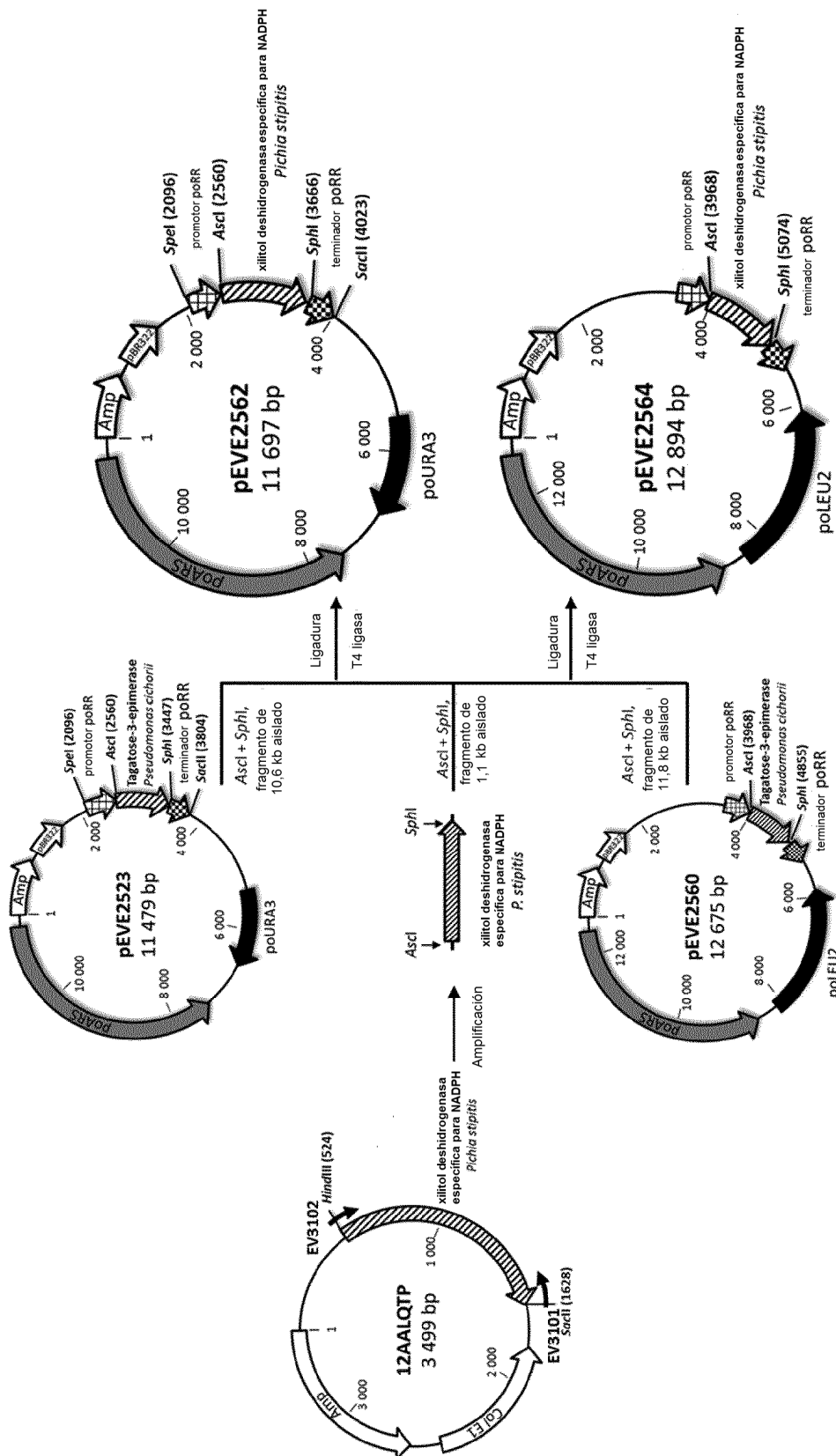


FIGURA 12

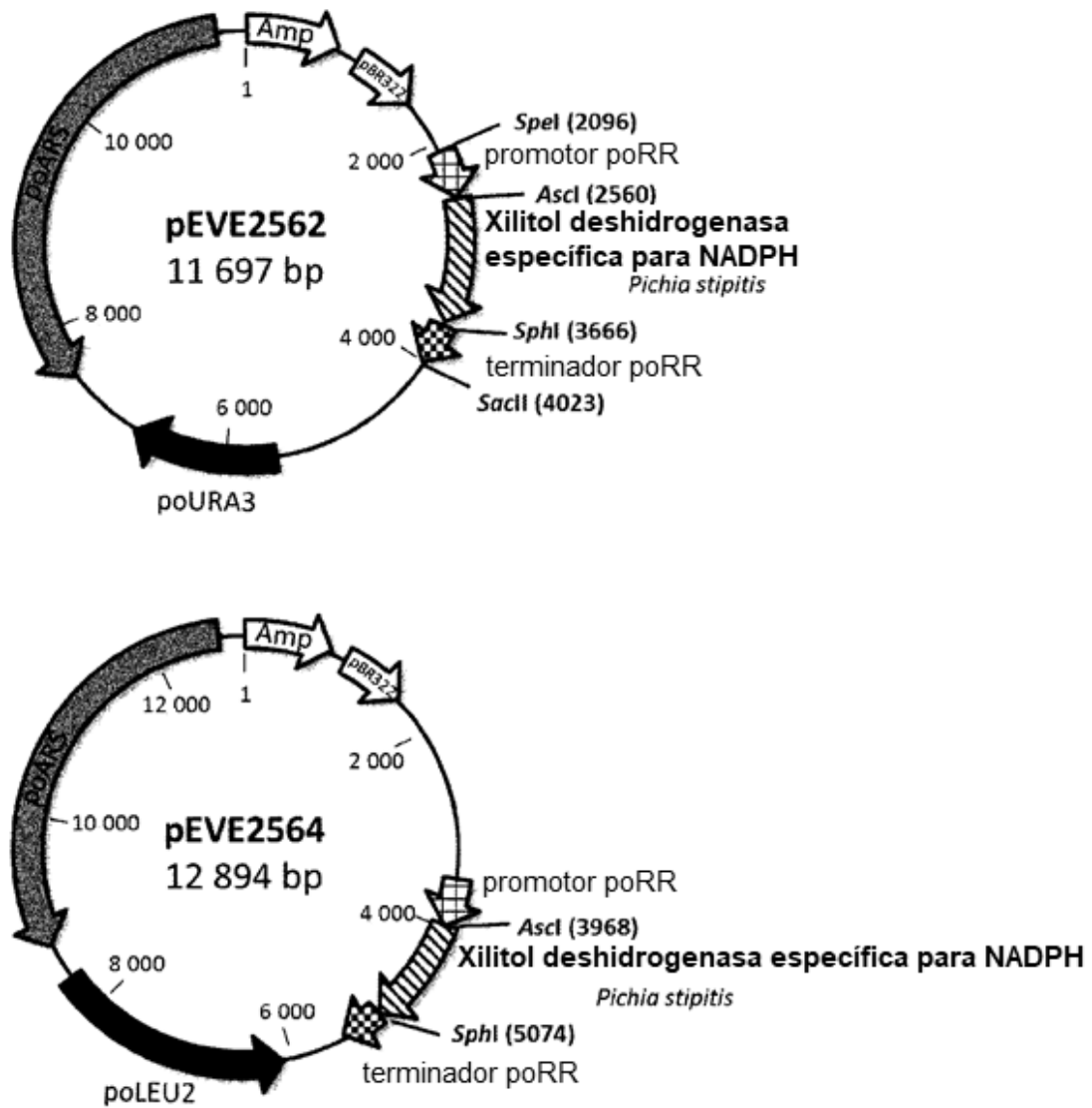


FIGURA 13

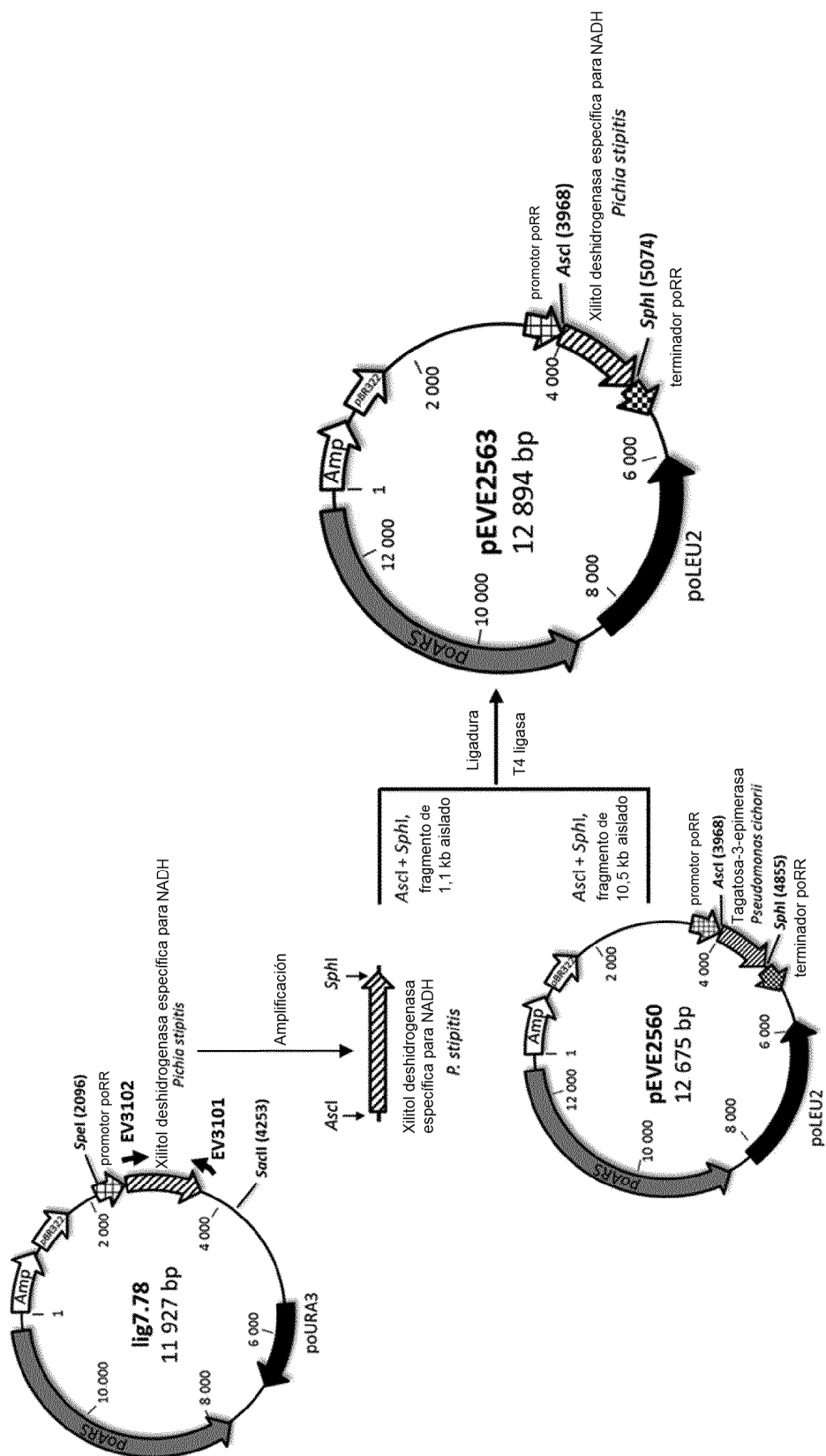


FIGURA 14

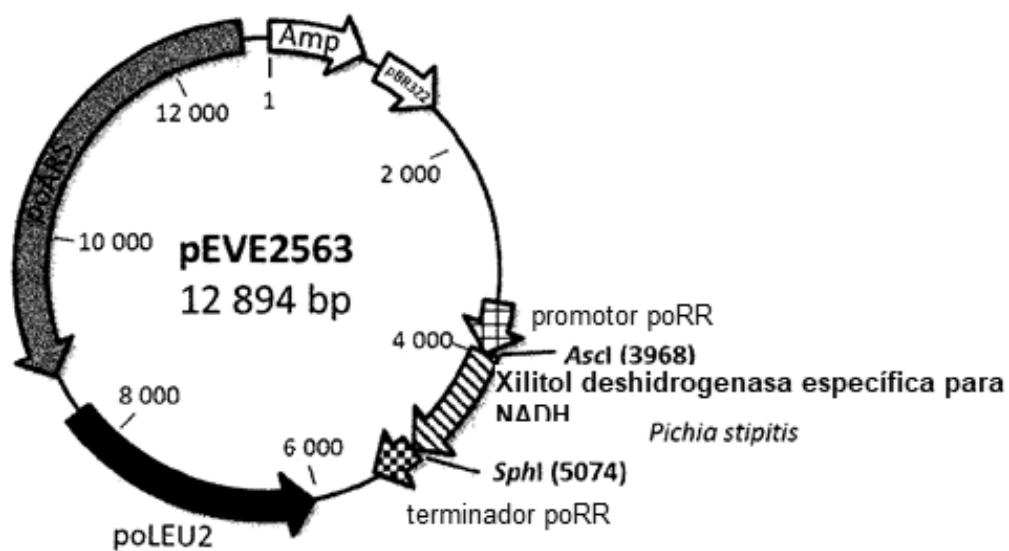


FIGURA 15

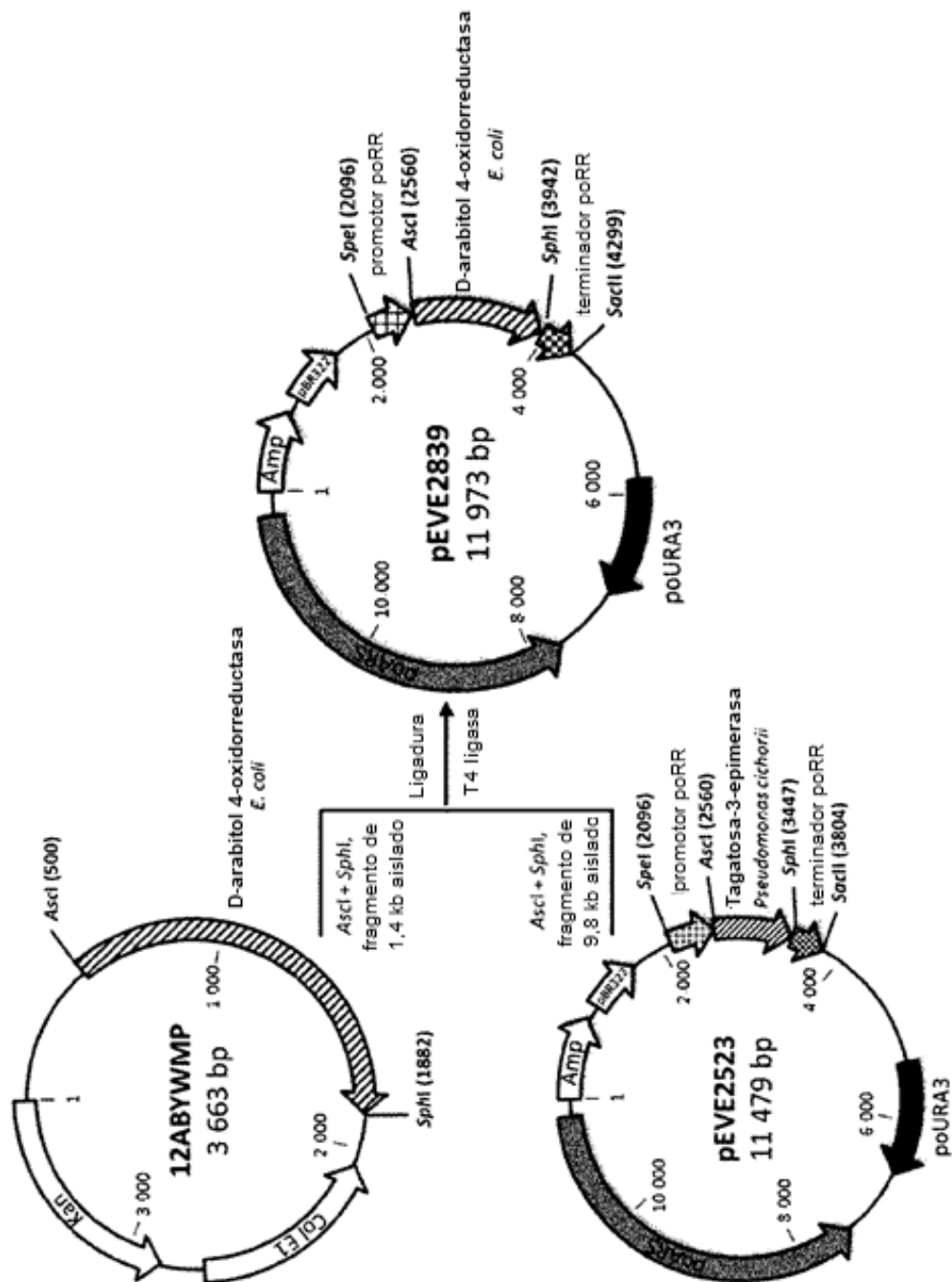


FIGURA 16

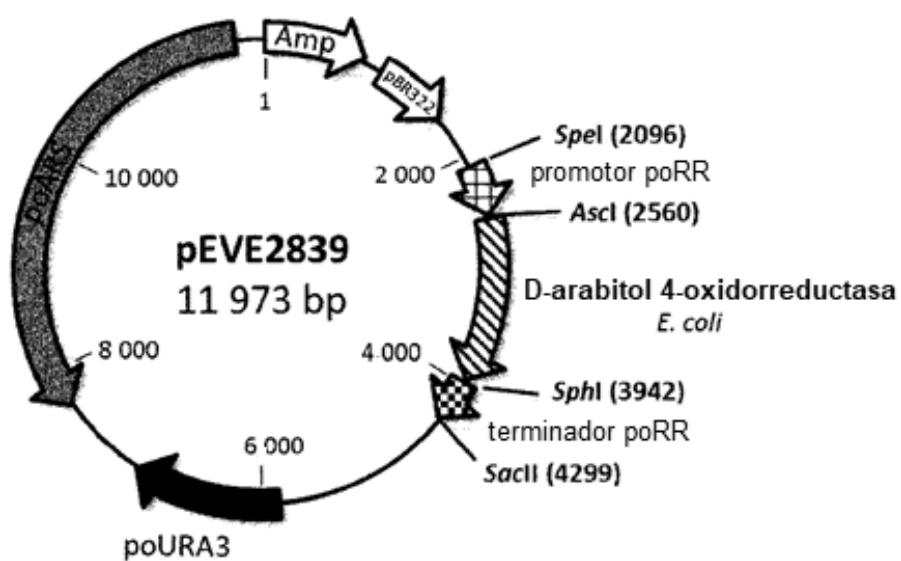


FIGURA 17

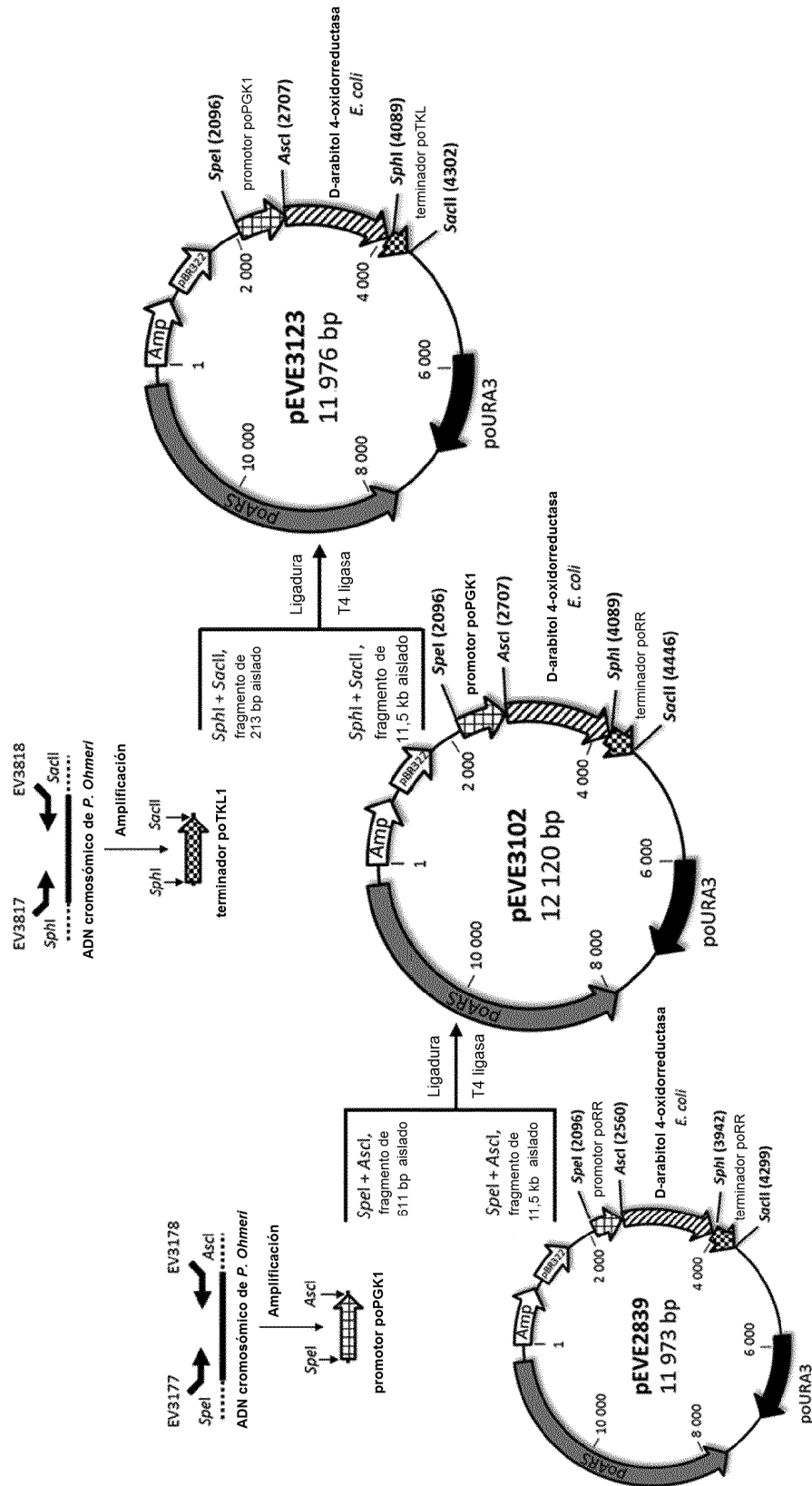


FIGURA 18

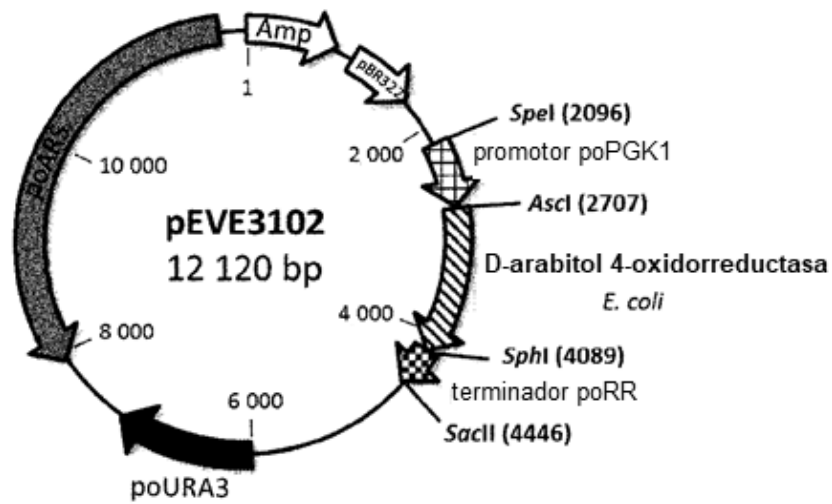


FIGURA 19

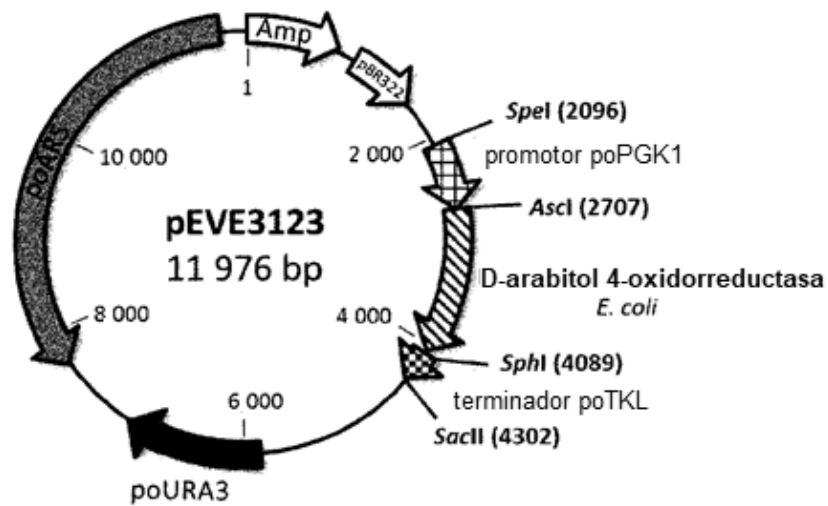


FIGURA 20

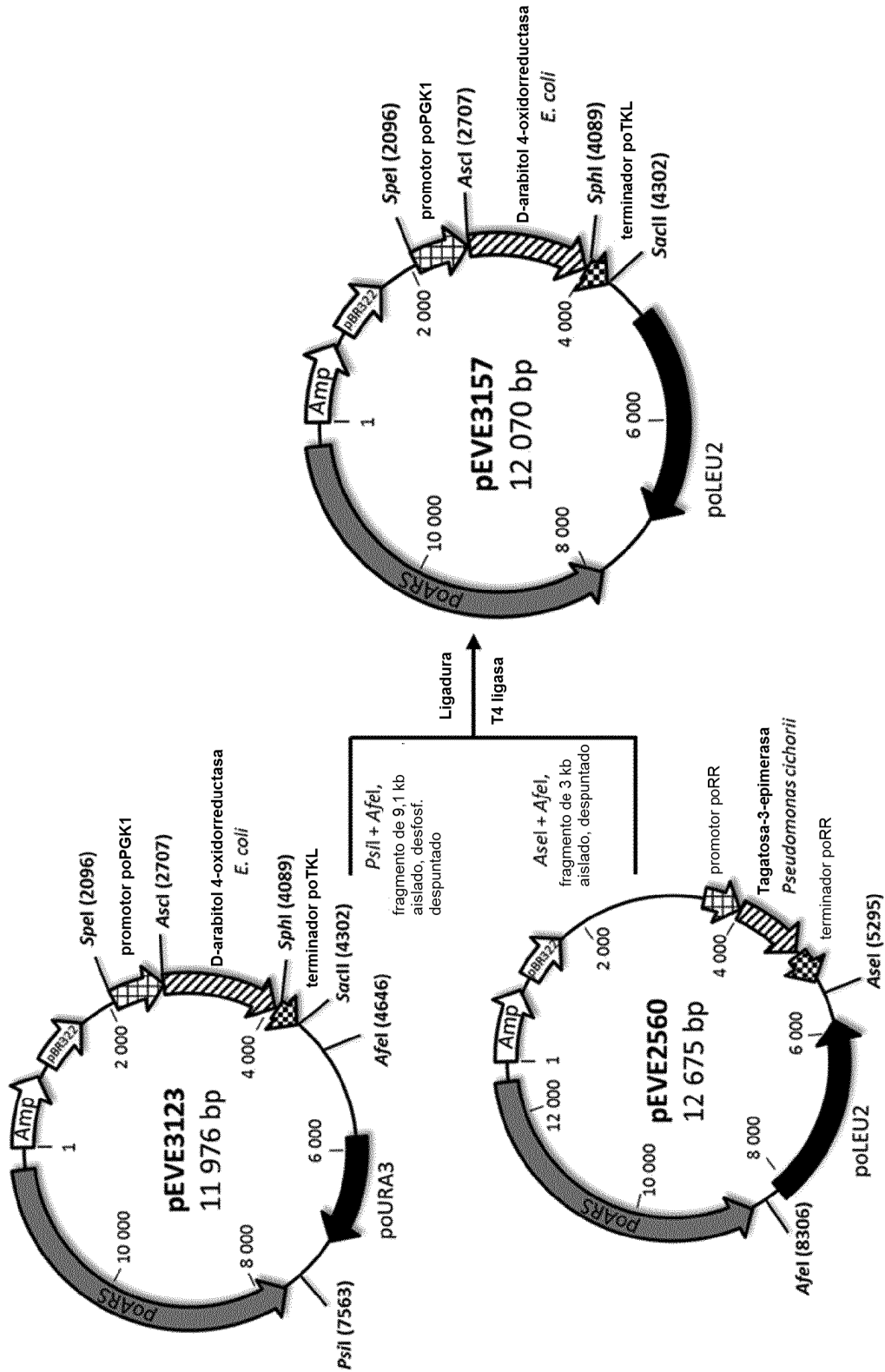


FIGURA 21

