

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 836**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18	(2006.01)	C12N 15/90	(2006.01)
C12N 9/12	(2006.01)		
C12N 9/90	(2006.01)		
C12N 9/92	(2006.01)		
C12N 15/52	(2006.01)		
C12P 7/06	(2006.01)		
C12P 7/10	(2006.01)		
C07K 14/395	(2006.01)		
C12N 15/81	(2006.01)		
C12P 7/12	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2015 PCT/EP2015/074522**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16062823**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2015 E 15784672 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3209678**

54 Título: **Variantes de transportador de Gal2 y sus usos**

30 Prioridad:

22.10.2014 EP 14189927

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

12.02.2020

73 Titular/es:

**BUTALCO GMBH (100.0%)
C/o Gewerbe-Treuhand AG, Achereggstrasse 10
6352 Zürich , CH**

72 Inventor/es:

**BOLES, ECKHARD;
DIETZ, HEIKO;
FARWICK, ALEXANDER;
SCHADEWEG, VIRGINIA y
OREB, MISLAV**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 741 836 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de transportador de Gal2 y sus usos

La presente invención se refiere a polipéptidos que son variantes de Gal2 que comprenden al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a T354 y opcionalmente otra sustitución o sustituciones de aminoácidos. La presente invención se refiere además con moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos y a células huésped que contienen dichas moléculas de ácido nucleico. La presente invención se refiere además con un procedimiento para la producción de bioetanol y/u otros compuestos de base biológica, que comprenden la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico, preferiblemente en dichas células huésped. La presente invención también se refiere a el uso de los polipéptidos, moléculas de ácidos nucleicos o células huésped para la producción de bioetanol y/u otros compuestos de base biológica y/o para la fermentación recombinante de biomaterial que contiene pentosa o pentosas, preferiblemente D xilosa y/o L-arabinosa.

Antecedentes de la invención

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* para cerveza, vino y para hornear ya se ha utilizado durante siglos para la producción de pan, vino y cerveza debido a su característica de fermentar azúcar en etanol y dióxido de carbono. En biotecnología, *S. cerevisiae* se usa particularmente en la producción de etanol para fines industriales, además de la producción de proteínas heterólogas. El etanol se utiliza en numerosas ramas de la industria como un sustrato inicial para las síntesis. El etanol está ganando cada vez más importancia como combustible alternativo, debido a la presencia cada vez más escasa de petróleo, el aumento de los precios del petróleo y la creciente demanda de gasolina en todo el mundo. Además, *S. cerevisiae* también se usa para la producción de otros biocombustibles o compuestos bioquímicos valiosos como isobutanol, ácido succínico, farnesen/farnesan o artemisinina.

Para hacer posible una producción de biocombustible con un precio favorable y eficiente, el uso de biomasa que contiene lignocelulosa, como por ejemplo paja, residuos de la industria de la madera y la agricultura y el componente orgánico de los residuos domésticos cotidianos, se presenta como un sustrato inicial. En primer lugar, dicha biomasa es muy conveniente y, en segundo lugar, está presente en grandes cantidades. Los tres componentes principales de la lignocelulosa son lignina, celulosa y hemicelulosa. La hemicelulosa, que es el segundo polímero que se encuentra con más frecuencia después de la celulosa, es un heteropolímero altamente ramificado. Consiste en pentosas (L-arabinosa, D-xilosa), ácidos urónicos (ácido 4-O-metil-D-glucurónico, ácido D-galacturónico) y hexosas (D-manosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-glucosa). Aunque la hemicelulosa se puede hidrolizar más fácilmente que la celulosa, contiene las pentosas L-arabinosa y D-xilosa, que normalmente no pueden ser convertidas por la levadura *S. cerevisiae*.

Para poder utilizar las pentosas para las fermentaciones, estas deben ingresar primero en la célula a través de la membrana plasmática. Aunque la *S. cerevisiae* no puede metabolizar la D-xilosa o la L-arabinosa, puede absorber la D-xilosa o la L-arabinosa en la célula. Sin embargo, *S. cerevisiae* no tiene un transportador específico. El transporte se realiza mediante los transportadores de hexosa. Sin embargo, la afinidad de los transportadores a la D-xilosa es claramente menor que a la D-glucosa (Kotter y Ciriacy, 1993). En levaduras que son capaces de metabolizar D-xilosa, como por ejemplo *P. stipitis*, *C. shehatae* o *P. tannophilus* (Du Preez *et al.*, 1986), existen dos transportadores inespecíficos de baja afinidad, que transportan D-glucosa, y también simportadores específicos de protones de alta afinidad solo para D-xilosa (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2001).

En experimentos anteriores, se encontraron algunas levaduras, como por ejemplo *Candida tropicalis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, que por naturaleza fermentan D-xilosa o L-arabinosa o al menos la pueden asimilar. Sin embargo, estas levaduras carecen totalmente de la capacidad de fermentar la L-arabinosa y la D-xilosa en etanol, o solo tienen un rendimiento de etanol muy bajo (Dien *et al.*, 1996). Además, aún se sabe muy poco acerca de la absorción de D-xilosa y L-arabinosa. En la levadura *C. shehatae* se asume un simportador de protones (Lucas y Uden, 1986). En *S. cerevisiae*, se sabe por la galactosa permeasa Gal2 que puede transportar D-xilosa pero también transporta L-arabinosa, que es muy similar en estructura a D-galactosa. (Kou *et al.*, 1970). La mayoría de los transportadores de hexosa pueden mediar la absorción de D-xilosa.

La fermentación alcohólica de pentosas en cepas de levadura biotecnológicamente modificadas de *S. cerevisiae*, en la que, inter alia, se utilizaron diversos genes de la cepa de levadura *Pichia stipitis* para la modificación genética de *S. cerevisiae*, se describió en los últimos años particularmente en relación con la fermentación de xilosa. La manipulación se concentró aquí particularmente en la introducción de los genes para la asimilación inicial de xilosa de *Pichia stipitis*, una levadura que fermenta la xilosa, en *S. cerevisiae*, es decir, en una levadura que se usa tradicionalmente en la producción de etanol a partir de hexosa (Jin *et al.* 2004).

Jeppson *et al.* (2006) describen la fermentación de xilosa por *S. cerevisiae* mediante la introducción de una vía metabólica de xilosa que es similar a la de las levaduras *Pichia stipitis* y *Candida shehatae*, que usan la xilosa de manera natural, o es similar a la vía metabólica bacteriana.

Katahira *et al.* (2006) describen los hidrolizados de ácido sulfúrico de la biomasa de lignocelulosa, como las astillas de madera, como un material importante para la producción de bioetanol combustible. En este estudio, se construyó una cepa de levadura recombinante, que es capaz de fermentar xilosa y celooligosacáridos. Para esto,

- diversos genes se integraron en esta cepa de levadura y en particular, para la expresión intercelular de la xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis* y la xiluloquinasa de *S. cerevisiae* y para la presentación de beta-glucosidasa de *Aspergillus acleatus* en la superficie celular. En la fermentación de hidrolizados de ácido sulfúrico de astillas de madera, la xilosa y los celooligosacáridos se fermentaron completamente con la cepa recombinante después de 36 horas.
- 5 Pitkanen *et al.* (2005) describen la obtención y caracterización de aislados de quimiostato de xilosa de una cepa de *S. cerevisiae*, que sobreexpresa genes de *Pichia stipitis* que codifican para la xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa y el gen que codifica la xiluloquinasa endógena. Los aislados se obtuvieron a partir de cultivos de quimiostatos aerobios en xilosa como fuente de carbono única o principal. Bajo condiciones aeróbicas en medio mínimo con 30 g/l de xilosa, la tasa de crecimiento de los aislados de quimiostato fue 3 veces mayor que la de la cepa original (0,15 h⁻¹ en comparación con 0,05 h⁻¹). La tasa de absorción de xilosa se incrementó casi el doble. Las actividades de las enzimas clave de la vía metabólica del fosfato de pentosa (transquetolasa, transaldolasa) aumentaron dos veces, mientras que las concentraciones de sus sustratos (pentosa-5-fosfatos, sedoheptulosa-7-fosfato) se redujeron en consecuencia.
- 10 Brat *et al.* (2009) cribaron bases de datos de ácidos nucleicos para detectar secuencias que codifican isomerasas de xilosa putativas y finalmente pudieron clonar y expresar con éxito un nuevo tipo altamente activo de isomerasa de xilosa de la bacteria anaeróbica *Clostridium phytofermentans* en *S. cerevisiae*. La expresión heteróloga de esta enzima confiere a las células de la levadura la capacidad de metabolizar la D-xilosa y usarla como la única fuente de carbono y energía.
- 15 Demeke *et al.* (2013) desarrollaron un casete de expresión que contenía 13 genes, incluido *C. phytofermentans xylA*, que codificaba la D-xilosa isomerasa y enzimas de la vía del fosfato de pentosa e insertaron el casete en dos copias en el genoma de la cepa industrial de *S. cerevisiae* Ethanol Red. La posterior mutagénesis por EMS, el barajado del genoma y la selección en hidrolizado de lignocelulosa enriquecida con D-xilosa, seguido de múltiples rondas de manipulación evolutiva en medio complejo con D-xilosa, establecieron gradualmente una fermentación de D-xilosa altamente eficiente.
- 20 Becker y Boles (2003) describen la manipulación y la selección de una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* que puede usar la L-arabinosa para el crecimiento y para fermentarla a etanol. Esto fue posible debido a la sobreexpresión de una vía metabólica bacteriana de L-arabinosa, que consiste en AraA de *Bacillus subtilis* y AraB y AraD de *Escherichia coli* y la sobreexpresión simultánea de la galactosa permeasa de levadura que transporta L-arabinosa en la cepa de levadura. El análisis molecular de la cepa seleccionada mostró que la precondition predeterminada para el uso de L-arabinosa es una actividad más baja de la L-ribuloquinasa. Sin embargo, inter alia, se reporta un crecimiento muy lento de esta cepa de levadura.
- 25 Wiedemann y Boles (2008) muestran que la expresión de los genes optimizados por codón de la L-arabinosa isomerasa de *Bacillus licheniformis* y L-ribuloquinasa y L-ribulosa-5-P 4-epimerasa de *Escherichia coli* mejoró fuertemente las tasas de conversión de L-arabinosa.
- 30 Farwick *et al.* (2014) desarrollaron un nuevo sistema para el cribado y manipulación de transportadores de pentosa que ya no están inhibidos por la glucosa. Este sistema se basó en una cepa de levadura fermentadora de D-xilosa que tenía eliminaciones de todos los transportadores de hexosa y todas las hexo/glucoquinasas (cepa *hxt⁰hvk⁰*). La D-glucosa ya no puede utilizarse como fuente de carbono, pero interfiere con la utilización de D-xilosa al nivel de transporte. Como resultado, los transportadores mutantes que permiten la absorción de D-xilosa en la presencia de concentraciones crecientes de D-glucosa podrían seleccionarse fácilmente. Usando este sistema en la manipulación evolutiva y las metodologías de mutagénesis, los autores pudieron generar transportadores de D-xilosa específicos a partir de transportadores de hexosa de *S. cerevisiae*. Algunos de estos transportadores mutantes tuvieron un intercambio en una posición correspondiente a N376 del transportador de galactosa Gal2. Sin embargo, aunque demostraron ser resistentes a la glucosa, la mayoría de ellos tenían una tasa de absorción reducida para la xilosa.
- 35 El documento WO 2008/080505 A1 divulga un transportador de arabinosa de *Pichia stipitis*, que permite a las células de levadura absorber L-arabinosa. El documento EP 11 001 841.3 divulga un transportador específico de arabinosa de la planta *Arabidopsis thaliana* para la construcción de levaduras que fermentan pentosa.
- 40 Los documentos WO 2012/049170 A2 y WO 2012/049173 A1 divulgan células de levadura que fermentan pentosa y glucosa que contienen y expresan entre otros ácidos nucleicos, un polipéptido con actividad de arabinosa permeasa que comprende una mutación en la posición T219 a asparagina o N376 a serina de Gal2 que vuelve al transportador resistente contra el efecto inhibitorio de la glucosa.
- 45 Todavía existe la necesidad en la técnica de transportadores específicos de pentosa, en particular transportadores específicos de D-xilosa, que tengan una mayor afinidad y/o una mayor actividad por las pentosas, en particular combinadas con resistencia a la glucosa, que permitan tomar específicamente la D-xilosa y/o L-arabinosa en células, como las células de levadura, con altas tasas de absorción incluso a bajas concentraciones de pentosa y
- 50
- 55

por lo tanto para promover la utilización y fermentación de pentosas, en particular D-xilosa y/o L-arabinosa y en particular en la presencia simultánea de glucosa.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar transportadores mejorados y/o más específicos, que transporten pentosa o pentosas, tales como D-xilosa y/o L-arabinosa con actividades más altas y/o afinidades más altas.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve mediante un polipéptido, que comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a T354 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,

en el que el polipéptido tiene al menos 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y en el que el polipéptido tiene una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve mediante una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve mediante una célula huésped, que contiene una molécula de ácido nucleico de la presente invención y que expresa preferiblemente dicha molécula de ácido nucleico, en la que dicha célula huésped es preferiblemente una célula de hongo y más preferiblemente una célula de levadura, tal como especies *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* sp., *Hansenula* sp., *Pichia* sp. o *Yarrowia* sp.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve mediante un procedimiento para la producción de bioetanol y/u otros compuestos de base biológica, que comprenden la expresión de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, preferiblemente en una célula huésped de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se resuelve utilizando un polipéptido de acuerdo con la presente invención, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, o una célula huésped de acuerdo con la presente invención para la producción de bioetanol y/u otros compuestos de base biológica,

y/o para la fermentación recombinante de biomaterial que contiene pentosa o pentosas, preferiblemente D-xilosa y/o L-arabinosa.

Descripción de las realizaciones preferidas de la invención

Antes de que la presente invención se describa con más detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no está limitada a los procedimientos, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Para los fines de la presente invención, todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad.

Variantes de Gal2

Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona variantes de Gal2.

En particular, la presente invención proporciona un polipéptido, que comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a T354 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

El polipéptido de la presente invención tiene una identidad de secuencia de 90 % o 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y tiene una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*.

Preferiblemente, el polipéptido de la presente invención es Gal2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos o proteínas de tipo salvaje de Gal2 de CEN.PK2-1C y CEN.PK113-7D. Gal2 de CEN.PK2-1C es una proteína de 574 aminoácidos. http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/FUNGI/getSeq.pl?seq=YLR081W_CEN.PK113-7D.

Los polipéptidos, preferiblemente las variantes de Gal2, de acuerdo con la invención comprenden al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a T354 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o de una secuencia de aminoácidos, que es al menos un 90 % idéntica, preferiblemente 95 % idéntica, y más preferiblemente 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

5 Como se usa en el presente documento, el término "en una posición correspondiente a" significa la posición respectiva en la SEQ ID NO: 1 que, sin embargo, en cadenas polipeptídicas relacionadas puede tener otro número de posición relativa. La sustitución equivalente puede determinarse comparando una posición en ambas secuencias, que puede alinearse con el propósito de comparación. La posición relativa del aminoácido puede variar debido a la diferente longitud del polipéptido relacionado, o eliminaciones o adiciones de aminoácidos en el polipéptido relacionado.

10 Los polipéptidos, preferiblemente las variantes de Gal2, de acuerdo con la invención tienen una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*, en particular una función de transporte de D-xilosa y/o L-arabinosa *in vitro* y/o *in vivo*.

10 Preferiblemente, la pentosa es D-xilosa y/o L-arabinosa.

Como se usa en el presente documento, si no se indica lo contrario, el término "xilosa" significa lo mismo que D-xilosa, "arabinosa" significa lo mismo que L-arabinosa, y "glucosa" significa lo mismo que D-glucosa.

15 Como se usa en el presente documento, el término "porcentaje (%) idéntico" se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos. La identidad se puede determinar comparando una posición en ambas secuencias, que puede alinearse con el propósito de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por el mismo aminoácido, las moléculas se consideran idénticas en esa posición.

20 Como se usa en el presente documento, el término "equivalente funcional" se refiere a secuencias de aminoácidos que no son 100 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y comprenden adiciones y/o inserciones y/o eliminaciones y/o sustituciones y/o intercambios de aminoácidos, que no alteran ni cambian la actividad o función de la proteína en comparación con la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, es decir, un "equivalente funcional", por ejemplo, abarca una secuencia de aminoácidos con sustituciones de aminoácidos conservadoras o eliminaciones y/o inserciones más pequeñas, siempre que estas modificaciones no afecten sustancialmente la función de transporte de la L-arabinosa *in vitro* y/o *in vivo*.

25 Generalmente, una persona experimentada en la técnica es consciente del hecho de que algunos intercambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una proteína no tienen influencia en la estructura (secundaria o terciaria), la función y/o la actividad de esa proteína. Las secuencias de aminoácidos con tales intercambios de aminoácidos "neutros" en comparación con las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención.

30 En una realización preferida, los polipéptidos, preferiblemente las variantes de Gal2, de acuerdo con la presente invención, que comprenden al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a T354 de la SEQ ID NO: 1, comprenden la sustitución de aminoácido T354A.

35 Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a T354 aumenta la actividad de la función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo* en comparación con el polipéptido sin dicha sustitución o sustituciones de aminoácidos.

Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a T354 aumenta la afinidad del polipéptido para pentosa o pentosas en comparación con el polipéptido sin dicha sustitución o sustituciones de aminoácidos.

- sustitución o sustituciones adicionales de aminoácidos.

40 En una realización, los polipéptidos, preferiblemente las variantes de Gal2, de acuerdo con la presente invención comprenden otra sustitución o sustituciones de aminoácidos:

preferiblemente sustitución o sustituciones de aminoácidos en una posición correspondiente a V71 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Dicha sustitución adicional de aminoácidos es preferiblemente V71I.

45 La presente invención proporciona preferiblemente los siguientes polipéptidos/variantes de Gal2:

- T354A
- T354A/V71I

Moléculas de ácido nucleico

50 Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención.

En una realización, la molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende además:

- secuencias vector de ácidos nucleicos, preferiblemente secuencias de vectores de expresión,

y/o

- secuencias promotoras de ácido nucleico y secuencias terminadoras de ácido nucleico,

y/o

5 - comprende otra secuencia reguladora de ácidos nucleicos.

En una realización, la molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende ADNds, ADNss, PNA, CNA, ARN o ARNm o combinaciones de estos.

10 Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprenden preferiblemente secuencias de ácido nucleico, que son (excepto por la adición de la sustitución o sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la invención) idénticas a la secuencia de ácido nucleico de origen natural o están optimizadas por codones para el uso en una célula huésped.

La molécula de ácido nucleico usada de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un constructo de expresión de ácido nucleico.

15 Los constructos de expresión de ácido nucleico de acuerdo con la invención son casetes de expresión que comprenden una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o vectores de expresión que comprenden una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un casete de expresión, por ejemplo.

Un constructo de expresión de ácido nucleico comprende preferiblemente secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras, que están unidas operativamente con la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido o polipéptidos de la invención.

20 El constructo de expresión de ácido nucleico puede comprender además secuencias de reconocimiento 5' y/o 3' y/o marcadores de selección.

Células huésped

Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona células huésped que contienen una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

25 Preferiblemente, las células huésped de la presente invención expresan dicha molécula de ácido nucleico.

Preferiblemente, una célula huésped de acuerdo con la presente invención es una célula de hongos y más preferiblemente una célula de levadura.

La célula de levadura es preferiblemente un miembro de un género seleccionado del grupo de especies de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* sp., *Hansenula* sp., *Pichia* sp. o *Yarrowia* sp.

30 La célula de levadura es más preferiblemente un miembro de una especie seleccionada del grupo de *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* y *Y. lipolytica*, tales como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* o *Y. lipolytica*.

En una realización preferida, la célula huésped pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

35 Cuando la molécula de ácido nucleico/secuencia que codifica el polipéptido (preferiblemente la variante o variantes de Gal2) de la presente invención se expresa en una célula huésped (preferiblemente una célula de levadura), a la célula huésped se le imparte la capacidad de absorber D-xilosa y/o L-arabinosa, que luego puede metabolizarse aún más. A través de esto, la célula puede crecer en D-xilosa y/o L-arabinosa como una fuente de carbono.

40 Preferiblemente, la célula huésped (preferiblemente la célula de levadura) tiene una tasa de absorción aumentada para D-xilosa y/o L-arabinosa en comparación con una célula que no contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

En una realización preferida, la célula huésped (preferiblemente la célula de levadura) de la presente invención contiene además

45 - moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas de una vía metabólica de xilosa (preferiblemente xilosa isomerasa y xiluloquinasa),

y/o

- moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas de una vía metabólica de arabinosa (preferiblemente isomerasa de arabinosa, riboquinasa, ribulosa 5-P 4-epimerasa).

Tal célula huésped tiene preferiblemente

- una tasa aumentada de utilización de D-xilosa y/o L-arabinosa y/o

- una tasa de crecimiento más rápida con D-xilosa y/o L-arabinosa en comparación con una célula que no contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

5 Por ejemplo, la célula huésped (preferiblemente la célula de levadura) de la presente invención puede contener además moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas de una ruta metabólica de arabinosa, en particular para arabinosa isomerasa, ribuloquinasa, ribulosa-5-P 4-epimerasa.

10 Se prefieren las proteínas de la ruta metabólica de la arabinosa bacteriana, en particular la araB L-ribuloquinasa de *E. coli*, la araD L-ribulosa-5-P 4-epimerasa de *E. coli* y la araA L-arabinosa-isomerasa de *B. licheniformis*.

15 En una realización preferida, una célula huésped (preferiblemente una célula de levadura) de acuerdo con esta invención se modifica por la introducción y expresión de los genes *araA* (L-arabinosa-isomerasa), *araB* (L-ribuloquinasa) y *araD* (L-ribulosa-5-P-4-epimerasa) y además sobreexpresa un gen *TAL1* (transaldolasa), como lo describen, por ejemplo, los inventores en el documento EP 1 499 708 B1 y además contiene al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Dependiendo del uso previsto de la célula de levadura, dicha célula de levadura puede contener, expresar o sobreexpresar otras secuencias de ácido nucleico que codifican otras proteínas, como la transaldolasa TAL1 y/o TAL2, la transketolasa TKL1 y/o TKL2, D-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa RPE1, ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa RKI1 o las secuencias correspondientes de otros organismos que codifican las mismas actividades enzimáticas.

20 Por ejemplo, la célula huésped (preferiblemente la célula de levadura) de la presente invención puede sobreexpresar adicionalmente moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de una ruta metabólica de la xilosa, en particular para la isomerasa de la xilosa y la xiluloquinasa.

Los preferidos son *Clostridium phytofermentans* o *Piromyces xylA* xilosa isomerasa y *S. cerevisiae* XKS1 xiluloquinasa.

25 En una realización preferida, una célula huésped (preferiblemente una célula de levadura) de acuerdo con esta invención se modifica mediante la introducción y/o sobreexpresión de los genes *xylA* (xiloseisomerasa), *XKS1* (xiluloquinasa) y además sobreexpresa un gen *TAL1* (transaldolasa).

30 Dependiendo del uso previsto de la célula de levadura, dicha célula de levadura puede contener, expresar o sobreexpresar otras secuencias de ácido nucleico que codifican otras proteínas, como la transaldolasa TAL1 y/o TAL2, la transketolasa TKL1 y/o TKL2, D-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa RPE1, ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa RKI1 o las secuencias correspondientes de otros organismos que codifican las mismas actividades enzimáticas.

Procedimientos y usos para la producción de bioetanol

Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de bioetanol y/u otros compuestos de base biológica.

35 Dicho procedimiento comprende la expresión de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, preferiblemente en una célula huésped de acuerdo con la presente invención.

Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona el uso de

- un polipéptido de acuerdo con la presente invención,

- una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, o

40 - una célula huésped de acuerdo con la presente invención,

para la producción de bioetanol y/u otros compuestos de base biológica,

y/o para la fermentación recombinante de biomaterial que contiene pentosa o pentosas, preferiblemente D-xilosa y/o L-arabinosa.

45 El término "compuestos de base biológica" u "otros compuestos de base biológica", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos y sustancias químicas, que se obtienen a partir de materiales biológicos y materiales crudos (biomasa), en particular utilizando microorganismos.

Los (otros) compuestos de base biológica pueden ser compuestos, que se seleccionan entre, pero no se limitan a:

ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico u otros ácidos orgánicos,

1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes,

aminoácidos, alcanos, terpenos, isoprenoides, disolventes, compuestos farmacéuticos, vitaminas.

Descripción adicional de realizaciones preferidas

Los inventores han identificado variantes de Gal2 que exhiben

- 5 - aumento de la actividad de la función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo* y/o
- aumento de la afinidad para pentosa o pentosas en comparación con el tipo salvaje o con un polipéptido Gal2 sin la sustitución o sustituciones de aminoácidos respectivas.

10 Los inventores, por lo tanto, han identificado variantes de Gal2 que, por lo tanto, confieren a una célula huésped (preferiblemente una célula de levadura) la capacidad de absorber D-xilosa y/o D-arabinosa y preferiblemente, la capacidad de una mayor absorción de pentosa o pentosas, preferiblemente D-xilosa y/o D-arabinosa.

Para esto, también se debe hacer referencia a los ejemplos y figuras.

- Absorción de L-arabinosa y D-xilosa

Para que la pentosa o pentosas, en particular, D-xilosa y/o L-arabinosa, pueda ser metabolizada por *S. cerevisiae*, primero debe ser absorbida por la célula.

15 Todos los transportadores de hexosa probados para la pentosa D-xilosa tienen una afinidad mucho mayor a las hexosas que a la D-xilosa. Para la L-arabinosa, se asume una situación similar. De todas las cepas construidas hasta ahora, que pueden utilizar pentosas (D-xilosa o L-arabinosa), se reporta un crecimiento relativamente lento. Sobre todo, la lenta y pobre absorción de las pentosas se menciona como una razón para esto (Becker y Boles, 2003; Richard *et al.*, 2002). En las fermentaciones en una mezcla de azúcar, que consiste en D-glucosa y D-xilosa o D-glucosa y L-arabinosa, los azúcares no se convierten simultáneamente. Debido a la alta afinidad de los

20 transportadores de D-glucosa, la D-glucosa se metaboliza al principio. Se produce un llamado cambio diaúxico. Solo después de que se agota la D-glucosa, la pentosa se convierte en una segunda fase de crecimiento claramente más lenta (Kuyper *et al.*, 2005a; Kuyper *et al.*, 2005b). La ausencia de transportadores específicos para pentosas se da como una explicación.

25 - Gal2

La hexosa galactosa es transportada por el transportador de alta afinidad Gal2 ($K_m = 1$ a 5 mM) que es igualmente afín para la glucosa ($K_m = 1,5$ a $1,9$) (ver, por ejemplo, Reifengerger *et al.*, 1997). Al igual que los otros genes estructurales necesarios para la utilización de galactosa (GAL1, galactosa quinasa; GAL10, mutarotasa/UDP-glucosa-4-epimerasa; GAL7, galactosa-1-fosfato uridil transferasa), su expresión se reprime en presencia de

30 glucosa y también necesita la inducción por galactosa. Gal2 también es objetivo de la inactivación de catabolitos (Horak y Wolf, 1997). Gal2 es uno de los pocos transportadores que puede transportar L-arabinosa. Como la mayoría de los otros transportadores de hexosa, puede transportar D-xilosa. Sin embargo, su afinidad por la L-arabinosa y la D-xilosa es bastante baja. Por lo tanto, a bajas concentraciones de D-xilosa o L-arabinosa, la actividad de absorción es muy baja.

35 Farwick *et al.* (2014) desarrollaron transportadores mutantes que permiten la absorción de D-xilosa en presencia de D-glucosa. Algunos de estos transportadores mutantes tuvieron un intercambio de aminoácidos en una posición correspondiente a N376 del transportador de galactosa Gal2. Sin embargo, aunque demostraron ser resistentes a la glucosa, la mayoría de ellos tenían una tasa de absorción reducida para la xilosa.

40 Los polipéptidos de la presente invención exhiben una mayor tasa de absorción y/o afinidad por la xilosa, en particular en combinación con mutaciones que los hacen resistentes a la inhibición por la glucosa.

Se tuvieron que usar diversos procedimientos de mutagénesis, así como manipulación evolutiva bajo condiciones muy específicas con cepas de levadura manipuladas con una variedad de diferentes modificaciones, para encontrar transportadores de pentosa derivados de Gal2 mejorados. Estos transportadores debían ser probados en sistemas de detección elaborados, con pruebas de crecimiento y ensayos de consumo de azúcar. Finalmente,

45 los transportadores mutantes tuvieron que ser secuenciados y a partir de una variedad de mutaciones, se tuvieron que aclarar cuáles fueron finalmente responsables de las propiedades mejoradas.

La D-xilosa representa hasta el 35 % del total de azúcares en la biomasa lignocelulósica rica en xilano, como maderas duras y paja (ver Demeke *et al.* 2013). Biomasa con cantidades significativas de arabinosa (fuente de los datos: Departamento de Energía de los Estados Unidos <http://www.eere.energy.gov/biomass/progs/search1.cgi>):

Tipo de biomasa	L-arabinosa [%]
Pasto varilla	3,66

Tipo de biomasa	L-arabinosa [%]
Bothriochloa Grande	3,55
Festuca alta	3,19
Robinia	3
Rastrojo de maíz	2,69
Paja de trigo	2,35
Bagazo de caña de azúcar	2,06
Lespedeza china	1,75
Sorgo bicolor	1,65

Las variantes de Gal2 de acuerdo con la invención también son de gran importancia para su utilización.

5 Las posibilidades para el uso de un transportador de pentosa funcional y al mismo tiempo específico en la levadura *S. cerevisiae* son, en primer lugar, la producción a partir de hidrolizados lignocelulósicos de bioetanol y la producción de productos precursores de alto grado para otras síntesis químicas, particularmente cuando las concentraciones de pentosa son bajas y en la presencia simultánea de glucosa.

La siguiente lista se origina en el estudio "Productos químicos de mayor valor agregado a partir de biomasa" (ver www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf). Aquí, 30 productos químicos se clasificaron como particularmente valiosos, que se pueden producir a partir de biomasa.

Número de átomos de C	Los 30 mejores candidatos
1	hidrógeno, monóxido de carbono
2	
3	glicerol, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido láctico, ácido malónico, ácido propiónico, serina
4	acetoina, ácido asparagínico, ácido fumárico, 3-hidroxibutirilactona, ácido málico, ácido succínico, treonina
5	arabitol, furfural, ácido glutámico, ácido itacónico, ácido levulínico, prolina, xilitol, ácido xilónico
6	ácido aconítico, citrato, ácido 2,5-furandicarboxílico, ácido glucárico, lisina, levoglucosano, sorbitol

10

Tan pronto como estos productos químicos se producen a partir de lignocelulosas por bioconversión (por ejemplo, fermentaciones con levaduras), es importante tener un transportador o transportadores específicos, altamente activos para los azúcares de hemicelulosa, arabinosa y xilosa.

Los siguientes ejemplos y dibujos ilustran la presente invención sin limitar, sin embargo, los mismos a esto.

15

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Prueba de crecimiento de Gal2_T354A en EBY.VW4000

Los transformantes se cultivaron en 5 ml de SCM-ura con 20 g/l de maltosa a 30°, se lavaron con agua y se ajustaron a una OD₆₀₀ de 1. De allí siguió una dilución en serie. Se hicieron gotear 5 µl en el medio respectivo y se incubó durante tres días a 30°. Como control de la dilución se tomó SCM-ura con 20 g/l de maltosa. Las células de los transportadores mutados se hicieron gotear sobre SCD-ura con un 0,2 % y un 2 % de glucosa, así como un SCG-ura con un 0,2 % y un 2 % de D-galactosa para probar su funcionalidad. Además, se utilizaron para la comparación el tipo salvaje de CEN.PK2 y Ethanol Red, así como Gal2_ep3.1. El transportador de galactosa con la mutación T354A es de HDY.GUF10.

Figura 2: Prueba de crecimiento de Gal2_T354A en AFY10

Los transformantes se cultivaron en 5 ml de SCE-ura-leu con etanol al 2 % a 30°, se lavaron con agua y se ajustaron a una OD₆₀₀ de 1. De allí siguió una dilución en serie. Se hicieron gotear 5 µl en el medio respectivo y se incubó durante cinco días a 30°. Como control de la dilución, se tomó SCE-ura-leu con etanol al 2 %. Las células de los transportadores mutados se hicieron gotear sobre SCX-ura-leu con D-xilosa al 0,2 % y 2 %, así como con SC-ura-leu con D-xilosa al 1 % con D-glucosa al 4 % y SC-ura-leu con D-xilosa al 0,2 % y D-glucosa al 2 % para probar su funcionalidad. Además, se utilizaron para la comparación el tipo salvaje de CEN.PK2 y Ethanol Red, así como Gal2_ep3.1. El transportador de galactosa con la mutación T354A es de HDY.GUF10.

Figura 3: Prueba de goteo de Gal2_T354A en combinación con V71I y L280R en EBY.VW4000 después de cuatro días a 30°. Se hacen gotear varias diluciones de izquierda a derecha (sin diluir, 1:10, 1:100, 1:1.000).

Figura 4: Prueba de goteo de Gal2_T354A en combinación con V71I y L280R en AFY10 después de seis días a 30°. Se hacen gotear varias diluciones de izquierda a derecha (sin diluir, 1:10, 1:100, 1:1.000).

Ejemplos

Procedimientos

Cepas y medios

25 - Bacterias

E.coli SURE (Stratageno)

Medio completo LB triptono al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl al 0,5 %, pH 7,5 (véase Sambrook y Russell, 2001)

30 Para la selección en una resistencia antibiótica codificada por plásmidos, se añadieron 40 µg/ml de ampicilina al medio después de esterilizar en autoclave. Los medios de cultivo sólidos contenían adicionalmente agar al 1,9 %. El cultivo tuvo lugar a 37 °C.

- Levadura

CEN.PK2-1C

MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2(EUROSCARF, Frankfurt)

35 - Cepa EBY.VW4000

EBY.VW4000 (Genotipo: *MATa leu2-3,112ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2 Δhxt1-17Δgal2 stlΔ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP*) (Wieczorke *et al.*, 1999)

Cepa Ethanol Red

Disponible de Lesaffre, Lille, Francia. Descrito en Demeke *et al.* (2013).

40 Cepa HDY.GUF10

Xilosa y arabinosa que consumen la cepa de *S. cerevisiae* industrial derivada de Ethanol Red (Dietz 2013).

Cepa AFY10

EBY.VW4000 *glk1Δ::loxP hxxk1Δ::loxP hxxk2Δ::loxP ylr446wΔ::loxP pyk2Δ::pPGK1-opt.XKS1-tPGK1 pTPI1-TAL1-tTAL1 pTDH3-TKL1-tTKL1 pPFK1-RPE1-tRPE1 pFBA-RKI1-tRKI1 loxP* (Farwick *et al.*, 2014).

45 Cepa AFY10X

AFY10 + YE_p-kanR_optXI (Farwick *et al.*, 2014).

- medio selectivo sintético completo SC

Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio al 0,67 %, sulfato de amonio al 0,5 %, dihidrogenofosfato de potasio 20 mM, pH 6,3, solución de aminoácido/nucleobase sin los aminoácidos correspondientes para los marcadores de auxotrofia de los plásmidos utilizados, fuente de carbono en la concentración respectiva indicada.

5

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

10

Los medios sólidos completos y selectivos contienen además agar al 1,9 %. El cultivo de las células de levadura tuvo lugar a 30 °C.

Plásmidos

Plásmido	Referencia
p426H7	Becker y Boles, 2003
YEp181_pHXT7-optXI_Clos	Subtil y Boles, 2012
p426H7_GAL2_WT	
p426H7_GAL2_ep3.1	
p426H7-GAL2_EtOHred	
p426H7-GAL2_GUF10	
p426H7_GAL2-T354A	
p426H7_GAL2-V71I	

15 Preparación de ADN

- Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

Las preparaciones a pequeña escala de ADN plasmídico de cultivos de *E. coli* se realizaron utilizando el kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El kit QUIAGEN Plasmid Maxi se utilizó para preparaciones a gran escala.

20 - Aislamiento de ADN plasmídico y genómico de *S. cerevisiae*

Para el aislamiento de ADN genómico y plasmídico de células de levadura, se cosecharon 5-10 ml de cultivos en fase estacionaria por centrifugación (1 min, 2.000x g) y se lavaron una vez en 1 ml de ddH₂O estéril. La pella celular se resuspendió en 400 µl de regulador YP 1 mediante agitación en vórtice y luego se lisó mediante la adición de 400 µl de regulador YP 2, 1/3 a 2/3 de volumen de perlas de vidrio (Ø 0,25-0,5 mm) y 8 minutos de agitación en un VXR básico Vibrax (IKA) a 2.000 rpm. Los residuos celulares se sedimentaron por centrifugación (30 segundos, 16.000x g) y se transfirieron 650 µl del sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Se agregaron 325 µl de regulador YP 3 frío y la muestra se agitó en vórtice y luego se incubó en hielo durante 10 minutos para la precipitación de proteínas y otros contaminantes. La muestra se centrifugó (10-15 min, 4 °C, 16.000x g), se transfirieron 700 µl del sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 700 µl de isopropanol. Después de mezclar vigorosamente, la muestra se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la precipitación del ADN, que luego se sedimentó mediante centrifugación (≥30 min, temperatura ambiente, 16.000x g). La pella de ADN se lavó dos veces con 500 µl de etanol frío (-20 °C) al 70 % (v/v), con etapas de centrifugación de 5 minutos a temperatura ambiente y 16.000x g, luego se secó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se disolvió en 15-30 µl de ddH₂O estéril según el tamaño de la pella de ADN.

25

30

- Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN se mide por fotometría espectral en un intervalo de longitud de onda de 240-300 nm. Si la pureza del ADN, determinada por el cociente E260nm/E280nm es 1,8, entonces la extinción E260nm= 1,0 corresponde a una concentración de ADN de 50 µg ADNds/ml (Sambrook y Russell, 2001).

5 - Purificación de ADN de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó con el "Kit de purificación de PCR QIAquick " de la compañía Qiagen, de acuerdo con la información del fabricante.

Digestión de ADN con endonucleasas de restricción (digestión por restricción)

10 Para la escisión de ADN específica de sitio, se utilizaron las endonucleasas de restricción de Biolaboratorios de Nueva Inglaterra (NEB) o Fermentas con los reguladores proporcionados y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Usualmente, se usaron 1-3 unidades por µg de ADN para la reacción, que se incubó durante 2-12 horas. Este procedimiento se utilizó para preparar vectores para la clonación por recombinación, para confirmar plásmidos ensamblados correctamente o para degradar específicamente un determinado plásmido de una mezcla.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

15 Se usaron diferentes polimerasas para diferentes experimentos de PCR en este trabajo. Para la confirmación de la eliminación o integración del gen genómico, se utilizó la polimerasa Crimson Taq (NEB). Para la amplificación de los ORFs (para la secuenciación), genes para la clonación recombinante o la amplificación de casetes integrativos para la eliminación o integración del gen genómico, se utilizaron las polimerasas de Phusion o Q5 (NEB). La composición de las reacciones de PCR y el programa de PCR correspondiente se muestran en las Tablas a continuación. Las temperaturas de recocido de los pares de cebadores se calcularon con la herramienta calculadora T_m en la página de inicio de NEB. Todas las PCR se realizaron en un gradiente Mastercycler (Eppendorf), Ciclador térmico Piko (Finnzymes) o ciclador de PCR Progene (Techne).

Composición de las reacciones de PCR con la polimerasa Crimson Taq

Componente	reacción de 15 µl	reacción de 25 µl	concentración final
5x regulador de reacción Crimson Taq	3 µl	5 µl	1x
Mezcla dNTP 2 mM	1,5 µl	2,5 µl	200 µM cada uno
cebador 10 µM (cada uno)	0,3	0,5 µl	0,2 µM cada uno
plantilla de ADN	variable	variable	variable
ADN polimerasa Crimson Taq	0,15 µl	0,25 µl	0,025 U/µl
agua libre de nucleasas	a 15 µl	a 25 µl	

25

Programa de PCR para reacciones con polimerasa Crimson Taq

Etapa	temperatura (°C)	tiempo
desnaturalización inicial	95	1 min
	95	22 seg
30-35 ciclos	45-68	35 seg
	68	1 min/kb

Etapa	temperatura (°C)	tiempo
extensión final	68	5 min
retención	4-10	

Composición de las reacciones de PCR con polimerasa Phusion o Q5

componente	reacción de 25 µl	reacción de 50 µl	concentración final
5x regulador de reacción Phusion HF/Q5	5 µl	10 µl	1x
Mezcla de dNTPs 2 mM	2,5 µl	5 µl	200 µM cada uno
Cebador 10 µM (cada uno)	0,5 µl	1 µl	200 µM cada uno
Plantilla de ADN	variable	variable	variable
ADN polimerasa Phusion/Q5 de Alta fidelidad	0,25 µl	0,5 µl	0,02 U/µl
agua libre de nucleasas		a 25 µl	a 50 µl

Programa de PCR para reacciones con polimerasa Phusion o Q5

Etapa	temperatura (°C)	Tiempo
desnaturalización inicial	98°C	1 min
	98°C	10 seg
15-35 ciclos	50-72°C	20 seg
		15 seg/kb (para plásmidos)
	72°C	30 seg/kb (para ADNg)
extensión final	72°C	5 min
retención	4-10°C	

5

PCR por fusión

Se utilizó una PCR por fusión para la construcción del ORF de HXT7-N370F para la clonación por recombinación. En la primera etapa, dos fragmentos superpuestos de HXT7 se amplificaron en dos reacciones de PCR Q5 separadas con p426H7_HXT7 como una plantilla. Las reacciones de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,5 % y los fragmentos correctos se purificaron a partir de las piezas de gel correspondientes. Se usó una cantidad molar igual de ambos fragmentos (20 ng como mínimo) en una reacción de PCR Q5 sin cebadores. Esta reacción de PCR se realizó durante 6 ciclos, antes de que se agregaran 1 µl de cebador directo e inverso (de soluciones madre 10 µM). La reacción se llevó a cabo durante otros 20 ciclos.

10

PCR propensa a errores (PCRep)

- 5 Para la generación de ORF mutagenizados aleatoriamente de GAL2, se aplicó el kit de mutagénesis aleatoria GeneMorph II (Agilent Technologies). Se siguió el protocolo del fabricante. La reacción de PCR se ejecutó durante 33 ciclos. La cantidad de ADN de plantilla se varió para lograr diferentes tasas de mutación (ver la Tabla a continuación) El análisis de los productos de epPCR reveló que se han cumplido las especificaciones de amplificación deseadas. Los fragmentos de PCR se purificaron y se usaron como plantillas para una reacción de PCR de Phusion para extender los extremos de los fragmentos con salientes homólogos.

Cantidad de ADN de plantilla utilizado en diferentes PCRRep y

tasa de mutación	cantidad de plantilla (intervalo aceptable)	amplificación	
		deseado	encontrado
Mediano (4,5-9 mut/kb)	205 ng (100-500 ng)	10-100	≈ 45
alto (9-16 mut/kb)	23 ng (0,1-100 ng)	100-10.000	≈ 250

Electroforesis en gel de agarosa para la separación de ADN o ARN

- 10 Los fragmentos en muestras de ADN o ARN se separaron por tamaño utilizando geles de agarosa con concentraciones que oscilan entre agarosa al 0,7 y al 2,0 % (p/v) (Sambrook y Russell, 2001). Se usó 1x regulador TAE para la preparación de geles y como regulador de ejecución. El DNA Ladder GeneRuler de 1 kb (Fisher Scientific) se usó para dimensionar los fragmentos de ADN. Las muestras de ADN se mezclaron con 1/5 de volumen de 6x colorante de carga de ADN antes de cargarlas en el gel. Las muestras de ARN se mezclaron con el mismo volumen de colorante de carga de ARN 2x, se incubaron a 96 °C durante 10 minutos y se almacenaron en hielo antes de la carga. Los geles se ejecutaron a hasta 6-10 V/cm durante 30 a 45 minutos, dependiendo de la corriente, el porcentaje de gel y los tamaños de fragmentos esperados. El ADN y el ARN se visualizaron mediante luz UV (254 nm) después de la incubación del gel en un baño de bromuro de etidio.

Purificación de ADN y extracción de ADN a partir de geles de agarosa

- 20 Para purificar el ADN (por ejemplo, a partir de reacciones de PCR o después de digestiones de restricción) y para extraer el ADN de los geles de agarosa, se usó el kit Extracto II NucleoSpin® (Macherey-Nagel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de ADN

- 25 La secuenciación de muestras de ADN fue realizada por GATC Biotech AG (Konstanz, Alemania). Las muestras contenían 30-100 ng/μl (plásmidos) o 10-50 ng/μl (productos de PCR) de ADN. Los cebadores adecuados (10 μM) se enviaron a GATC Biotech junto con la muestra de ADN.

Transformación de *E. coli*

- 30 Las células de *E. coli* se transformaron por electroporación de acuerdo con el protocolo de Dower (Dower *et al.*, 1988) y Wirth (Wirth, 1989) utilizando un Pulsador de Genes Bio-Rad. Se añadió ADN (a partir de *E. coli* o preparaciones de ADN de levadura) a las células de *E. coli* competentes congeladas y la muestra se incubó y se descongeló durante 10 minutos en hielo. La suspensión celular se transfirió luego a cubetas de electroporación y se pulsó directamente. El Pulsador de Genes Bio-Rad se ajustó a un voltaje de 2,5 kV por cm, una resistencia de 200 Ω y una capacidad de 25 μF. Inmediatamente después del pulso, las células se mezclaron con 1 ml de medio SOC precalentado y se transfirieron a un tubo eppendorf. Las células se incubaron a 37 °C durante 45 min a 600-35 800 rpm en un termomezclador (Eppendorf) antes de sembrarlas en placas de agar LB selectivas que contenían canamicina o ampicilina. En el caso de que las células se transformaran con un plásmido codificador de HXT7, la incubación se realizó a temperatura ambiente durante 4 horas sin agitación o a 20-25 °C con agitación durante 2 horas.

Transformación de *S. cerevisiae*

- 40 Para la transformación de *S. cerevisiae*, se utilizaron dos protocolos diferentes del procedimiento de ADN/PEG portador de LiAc/SS de Gietz *et al.* (Gietz y Schiestl, 2007a, Gietz y Schiestl, 2007b) con pequeñas desviaciones. Los cultivos líquidos se cultivaron en un medio adecuado a una OD de 0,6-1,0. La centrifugación del cultivo y para las etapas de lavado se acortaron a 2 minutos a 3.000x g. El ADN portador monocatenario se usó como una solución de 10 mg/ml, permitiendo un volumen de 54 μl o 74 μl de ADN en la mezcla de transformación, respectivamente. La duración del choque térmico fue de 35 minutos. Después de la transformación, toda la 45 suspensión celular se sembró sobre placa directamente en el medio de selección o en caso de transformaciones

con un marcador de selección dominante, se transfirió a 5 ml de medio líquido apropiado para la regeneración. Después de la regeneración, las células se sedimentaron, se resuspendieron en 50-100 µl de medio y se sembraron en placas.

5 Las cantidades de ADN para transformaciones fueron aproximadamente 500 ng para plásmidos individuales, ≥ 1.000 ng cada uno para cotransformaciones con plásmidos múltiples y ≥ 2.000 ng y más para casetes de ADN integrativos (por ejemplo, para la eliminación de genes).

Optimización por codones de genes

10 El ORF de algunos genes ha sido optimizado por codones. Los codones se han adaptado al uso de codones de *S. cerevisiae* según lo determinado por los codones preferidos de los genes glicolíticos. Descrito en Wiedemann *et al.* (Wiedemann y Boles, 2008).

Construcción de plásmidos por recombinación homóloga (clonación recombinante)

15 Los plásmidos se construyeron *in vivo* mediante recombinación homóloga de fragmentos de ADN adecuados (esqueleto del vector e inserto o insertos) en *S. cerevisiae*. Para este propósito, el vector respectivo se linealizó en el sitio de inserción por digestión por restricción. Opcionalmente, el esqueleto del vector resultante se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior extracción del gel. Los insertos se diseñaron para tener secuencias flanqueantes (> 30 pb) homólogas a la región objetivizada para la inserción o en caso de múltiples fragmentos de inserciones, entre sí. Los insertos se amplificaron por PCR y se podrían proporcionar secuencias homólogas utilizando cebadores con los extremos 5' correspondientes (salientes homólogos). *S. cerevisiae* se transformó con los fragmentos de ADN y los transformantes se sembraron sobre placas en medio selectivo. Las colonias se seleccionaron para inocular medio líquido selectivo. El ADN se aisló de estos cultivos y se usó para la transformación de *E. coli* para la separación y proliferación de plásmidos. Los plásmidos que contienen el gen inhibidor de la girasa *ccdB* son tóxicos para la mayoría de las cepas de *E. coli*, por lo que para estos plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli* DB3.1 resistente a *ccdB*. Los plásmidos se aislaron de cultivos de una sola colonia de *E. coli* y se verificaron mediante digestión de restricción analítica y secuenciación de ADN. Se establecieron cultivos madre de glicerol para los clones correctos.

Eliminación o inserción de genes genómicos por recombinación homóloga

30 Para las eliminaciones de genes en el genoma de *S. cerevisiae*, los casetes marcadores se integraron en el gen respectivo mediante recombinación homóloga (Carter y Delneri, 2010, Güldener *et al.*, 1996, Sauer, 1987). Los casetes marcadores se amplificaron por PCR utilizando cebadores con extremos 5' homólogos al gen objetivo para permitir la inserción dirigida al sitio. Los casetes están compuestos de un gen marcador dominante (*kanMX4/G418*, *hphNT1/Higromicina B*, *natNT2/clonNAT*), flanqueados por un promotor (*pTEF*) y un terminador (*tTEF*, *tCYC1* y *tADH1*, respectivamente) y sitios *loxP*. Estos sitios permiten la escisión de los casetes de marcadores integrados en el genoma por la recombinasa *cre*, que borra el marcador para otra ronda de eliminación de genes. Después de la transformación de *S. cerevisiae* con un casete de eliminación, las células se sembraron sobre placa en medio selectivo y se sembró una réplica sobre placa una sola vez en el mismo medio. Las colonias individuales se volvieron a separar para obtener clones individuales, que luego se recogieron y se cultivaron en medio selectivo. El ADN se aisló de estos cultivos y la integración correcta se confirmó mediante PCR con diferentes combinaciones de cebadores. Los cebadores para confirmación se denominan como se ve en la tabla a continuación. Se establecieron cultivos madre de glicerol para los clones correctos.

40 **Nomenclatura de los cebadores utilizados para la confirmación de la integración genómica por PCR**

nombre	posición	dirección
A1	corriente arriba del sitio de integración	corriente abajo
A2	dentro de la región que se ve reemplazada por la integración	corriente arriba

(continuación)

nombre	posición	dirección
A3	dentro de la región que se ve reemplazada por la integración	corriente abajo
A4	corriente abajo del sitio de integración	corriente arriba
K2	dentro del casete de eliminación/gen que está integrado	corriente arriba
K3	dentro del casete de eliminación/gen que está integrado	corriente abajo

5 Para reciclar el marcador, las células se transformaron con un plásmido que codifica la recombinasa cre bajo el control del promotor GAL1 inducible por galactosa (pSH47 o pNatCre). Después de una breve inducción de la recombinasa, las células se seleccionaron para la pérdida del marcador dominante mediante sembrado sobre placa en réplica. Dado que la expresión completa de la recombinasa es letal en las cepas hxt⁰, se usó la expresión basal de la recombinasa bajo condiciones no inductoras para estas cepas. La eliminación del casete se controló de nuevo mediante PCR (ver arriba). La integración de los casetes de genes para la sobreexpresión de genes se realizó en consecuencia. Dentro de estos casetes, solo el marcador dominante está flanqueado por sitios loxP y se corta, el resto del casete permanece en el genoma.

10

Lista de cebadores

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3') [SEQ ID NO.]	Descripción
GAL2_for	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAATGGCAGTTGAGGAGAACAA [SEQ ID NO. 2]	Cebador hacia adelante para amplificación de GAL2
GAL2_rev	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATG ACTCGAGTTATTCTAGCATGGCCTTGTACC [SEQ ID NO. 3]	Cebador hacia atrás para amplificación de GAL2
GAL2 T354A fw	TTATTTTTTCTACTACGGTGCCGTTATTTTCA AGTCAG [SEQ ID NO. 4]	Cebador hacia adelante para mutagénesis de T354 a A en GAL2
GAL2 T354A rv	GACTTGAAAATAACGGCACCGTAGTAGAAA AAATAATTG [SEQ ID NO. 5]	Cebador hacia atrás para mutagénesis de T354 a A en GAL2
GAL2 V71I fw	GTCTGAATAIGTTACCATFTCCTTGCTTTGTT TGTG [SEQ ID NO. 6]	Cebador hacia adelante para mutagénesis de V71 a I en GAL2

(continuación)

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3') [SEQ ID NO.]	Descripción
GAL2 V71I rv	AAACAAAGCAAGGAAATGGTAACATATTCA GACATG [SEQ ID NO. 7]	Cebador hacia atrás para mutagénesis de V71 a I en GAL2

Procedimientos para el cultivo de células y experimentos de fermentación

Determinación espectrofotométrica de la densidad celular

- 5 La concentración celular en un cultivo líquido se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}). Las muestras del cultivo celular o sus diluciones se colocaron en una cubeta de poliestireno (PS) y se analizaron en un espectrofotómetro pro Ultraspec 2100 (GE Healthcare, Estados Unidos) a 600 nm.

Cultivos madre de glicerol

- 10 Para el almacenamiento a largo plazo de cepas específicas y *E. coli* que contiene plásmidos, se prepararon cultivos madre de glicerol. Para este propósito, los cultivos estacionarios de *S. cerevisiae* o los cultivos en crecimiento de *E. coli* se mezclaron 1:1 con glicerol al 50 % (v/v) y se almacenaron a -80 °C.

Cultivo de agar semisólido

- 15 El procedimiento de cultivo de agar semisólido se eligió para expandir la biblioteca de ADNc del plásmido (en *E. coli*). Mediante este procedimiento, se pueden minimizar los sesgos de representación que pueden ocurrir durante el crecimiento en cultivo líquido. La incubación se realiza a 30 °C, ayudando a estabilizar los clones inestables (Hanahan *et al.*, 1991, Sassone-Corsi, 1991). El protocolo se puede encontrar en el sitio web de Life Technologies. En resumen, el medio LB concentrado 2x se mezcla con 3 g/l de agarosa SeaPrep mientras se agita, se esteriliza en autoclave y se enfría a 37 °C. El antibiótico y $4 \cdot 10^5$ a $6 \cdot 10^5$ (por 450 ml de medio) se añaden al medio y se mezclan durante 2 minutos. Luego, las botellas se incuban en un baño de hielo a 0 °C durante 1 hora y luego se transfieren cuidadosamente a 30 °C durante 40-45 horas de incubación (sin perturbaciones). Después del crecimiento, las células se pueden sedimentar del agar semisólido mediante centrifugación a 10.400x g.

Ensayos de mancha de dilución en serie (pruebas de goteo)

- 25 Para facilitar la comparación del crecimiento de diferentes cepas de *S. cerevisiae* bajo diversas condiciones de crecimiento, se realizó un ensayo de mancha de dilución en serie. Las células se cultivaron en cultivo líquido hasta la fase exponencial en medio apropiado, se recogieron por centrifugación (2.000x g, 2 min), se lavaron dos veces con agua estéril y luego se resuspendieron a una OD_{600} de 1,0 en medio selectivo sin fuente de carbono. A partir de esta suspensión celular, se preparó una dilución en serie diez veces en medio selectivo (cuatro etapas de dilución). Se sembraron 6 μ l de cada suspensión celular en placas del medio para examinarlas y se dejaron secar. Las placas se incubaron a 30 °C.

30 Fermentaciones aerobias por tandas

Las fermentaciones aerobias por tandas se realizaron en matraces de agitación de diferentes tamaños (volumen 5-10x del volumen de cultivo) en agitadores rotatorios (150-180 rpm) generalmente a 30 °C. La manipulación evolutiva se realizó como una fermentación aerobia por tandas en serie (ver detalles a continuación)

Fermentaciones anaerobias por tandas

- 35 Para las fermentaciones anaerobias por tandas, los matraces de agitación se sellaron con un tapón de goma y un cierre de fermentación. El volumen de los matraces fue igual al volumen de cultivo de 100 ml. Los cultivos se agitaron continuamente a 120 rpm en un agitador magnético a 30 °C. En este trabajo, las fermentaciones se realizaron a $OD_{600} = 10$. Para este fin, las células cultivadas se cosecharon y se ajustaron a una OD_{600} de 20 en 50 ml de medio de fermentación sin fuente de carbono. Para comenzar el experimento, esta suspensión celular se
- 40 añadió a los matraces preparados que contenían 50 ml de medio de fermentación suplementado con una fuente de carbono concentrado 2x. Las muestras para la determinación de la concentración celular y para el análisis de HPLC se tomaron a través de la inserción de una aguja y jeringa estériles.

Fermentaciones anaerobias en un fermentador

Algunas fermentaciones con cepas industriales de *S. cerevisiae* se realizaron en un fermentador Infors Multifors (2x 1,41) con un volumen de trabajo de 800 ml y equipado con sensores de temperatura, pH, O₂ y CO₂. El fermentador se llenó con 530 ml de medio de fermentación concentrado (sin fuente de carbono y suplementos) y luego se esterilizó en autoclave. Antes del inicio de la fermentación, se agregaron al medio concentrado 250 ml de solución de fuente de carbono concentrada, 100 µl/l de Antiespumante 204 y los otros suplementos (vitaminas, elementos traza y antibióticos). El fermentador se purgó con gas de nitrógeno para crear inicialmente condiciones anaerobias. Se aplicó una alimentación de gas de nitrógeno al espacio de cabeza (0,4 l/min) durante el experimento para mantener las condiciones anaerobias. La salida de gas se enfrió para condensar y devolver vapor y luego se canalizó a través de una botella de lavado de gas. El cultivo se agitó a 300 rpm, la temperatura se mantuvo a 35 °C y el pH se mantuvo a 5,0 mediante la adición automática de KOH 2M o H₂PO₄ 2M. El inóculo de las células (en 20 ml de medio de fermentación) se agregó cuando todos los parámetros establecidos se alcanzaron y se mantuvieron constantes. Durante las fermentaciones, se tomaron muestras para la determinación del peso seco celular y el análisis por HPLC. Se utilizó el software Iris 5.2 (Infors) para operar el fermentador y monitorear el experimento.

15 **Determinación de masa celular seca**

Para determinar la masa celular seca, se filtraron al vacío 5-10 ml de un cultivo líquido a través de un filtro prelavado y se secaron (como se describe a continuación) (nitrocelulosa, tamaño de poro 0,45 µm) y posteriormente se lavaron dos veces con ddH₂O. Los filtros se secaron en un horno de microondas a 120-150 W durante 15 minutos y se dejaron enfriar y se secaron más en un desecador durante otros 15 minutos. Los filtros se pesaron antes del filtrado y después del secado para medir el peso seco de la célula. El procedimiento descrito ha sido adaptado de Ask *et al.* (Ask *et al.*, 2013).

Manipulación evolutiva

La manipulación evolutiva se realizó como una fermentación aerobia por tandas en serie. Los transformantes se inocularon primero en SCE₂ selectivo para obtener biomasa y luego se cultivaron en medio SC y SM selectivo con 20 g/l de xilosa para adaptar la cepa a la utilización de xilosa. Después de estos cultivos iniciales, las células se cambiaron a medio con 10 g/l de xilosa y concentraciones crecientes de glucosa para aplicar una presión evolutiva. Cuando estaban alcanzando la fase exponencial tardía a la fase estacionaria temprana, las células se cosecharon mediante centrifugación (2.000x g, 2 min) y se transfirieron a medio fresco a una OD₆₀₀ de 0,2. Las concentraciones de glucosa aumentaron cada vez que se pudo ver una adaptación o el crecimiento no se vio afectado negativamente por la concentración de glucosa actual. A todos los medios, líquidos y sólidos, se agregó G418 para seleccionar el fondo de la cepa AFY10. Los medios líquidos además contenían 0,5 g/l de 2-deoxi-D-glucosa (2-DOG) para suprimir la formación de mutantes supresores del fenotipo *hxx*⁰. Las cepas *hxx*⁰, pero no las de tipo salvaje, son resistentes al 2-DOG (Subtil y Boles, 2012). La falta de consumo de glucosa se ha confirmado mediante la separación de muestras de cultivo en placas de medios de glucosa y también mediante análisis de HPLC.

Análisis de metabolitos por HPLC

Para el análisis de los metabolitos, muestras libres de células (5-10 min, 4 °C, 16.000x g) se mezclaron con 1/9 de volumen de ácido 5-sulfosalicílico al 50 % (p/v) y se centrifugaron (5-10 min, 4 °C, 16.000x g). El sobrenadante se analizó en un sistema UHPLC+ por Thermo Scientific (Dionex UltiMate 3000) equipado con una columna HyperREZ XP Carbohidrato H⁺ 8 µm y un detector de índice de refracción (Thermo Shodex RI-101). La separación se llevó a cabo a una temperatura de la columna de 65 °C con ácido sulfúrico 5 mM como fase móvil con una tasa de flujo de 0,6 ml/min. El software Chromeleon 6.80 se utilizó para controlar el sistema y analizar los datos. Se analizaron cinco estándares (mezclas de D-glucosa, D-xilosa, xilitol, acetato, glicerol y etanol con concentraciones de 0,01-3 % (p/v)) para la cuantificación de los diferentes compuestos.

45 **Ensayos de absorción de azúcar**

Los ensayos de absorción de azúcar se realizaron según lo descrito por Bisson *et al.* (Bisson y Fraenkel, 1983) con modificaciones de acuerdo con Walsh *et al.* (Walsh *et al.*, 1994).

Los transformantes de la cepa EBY.VW4000 se cultivaron en YEPE selectivo a una OD de 1,1-1,6, se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces en regulador de absorción enfriado con hielo (temperatura ambiente, 3 min, 3.000x g). Las células se mantuvieron en hielo de aquí en adelante. La pella celular se resuspendió en regulador de absorción enfriado con hielo a una concentración de 60 mg_{ww}/ml y se dividió en partes alícuotas a 110 µl. Una alícuota de suspensión celular y una solución de azúcar se incubaron en un baño de agua a 30 °C durante 4-5 minutos. Se pipetearon 100 µl de la suspensión celular a la solución de azúcar (50 µl), se mezclaron brevemente mediante pipeteo y se incubaron durante 5 (D-[U-¹⁴C]-glucosa) o 20 segundos (D-[1-¹⁴C]-xilosa). La reacción de absorción se detuvo transfiriendo 100 µl de la mezcla a 10 ml de regulador de extinción en hielo, que se filtró inmediatamente a través de un filtro de membrana Durapore (tamaño de poro de 0,22 µm, Millipore). El filtro se lavó dos veces con 10 ml de solución reguladora de extinción en hielo, se transfirió a un vial de centelleo que contenía 4 ml de cóctel de centelleo (Rotiszint eco plus, Roth) y se agitó vigorosamente. Además de esta

muestra de filtro ($\text{cpm}_{\text{filtro}}$), se transfirieron 10 μl de cada reacción directamente a un vial de centelleo con 4 ml de cóctel de centelleo para la determinación de los recuentos totales en la reacción ($\text{cpm}_{\text{total}}$). Para determinar un valor para el azúcar que está enlazado inespecíficamente a la superficie celular o al filtro ($\text{cpm}_{\text{blanco}}$), se mezclaron unas pocas muestras de 33,3 μl de solución de azúcar y 66,6 μl de suspensión celular en 10 ml de regulador de extinción en hielo y se trataron como se describe anteriormente. La radioactividad de todos los viales se analizó en un contador de centelleo líquido Wallac 1409.

Se utilizaron soluciones madre de glucosa o xilosa 2M, 500 mM o 20 mM (en H_2O) para preparar las soluciones de azúcar para los ensayos (tres veces la concentración deseada en la reacción de absorción (S, concentración de sustrato), alícuotas de 50 μl). La absorción se midió a concentraciones de azúcar de 0,2, 1, 5, 25 y 100 mM para glucosa y 1, 5, 25, 66, 100, 200 y 500 mM para xilosa. La inhibición de la absorción de xilosa por la glucosa se midió a 25, 66 y 100 mM de xilosa con 25 y 100 mM de glucosa sin marcar adicional. Las soluciones de azúcar contenían 0,135 a 0,608 μCi de D-[U- ^{14}C]-glucosa (290-300 mCi/mmol) o D-[1- ^{14}C]-xilosa (55 mCi/mmol) (American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, Estados Unidos).

Los datos de los ensayos de absorción se utilizaron para los siguientes cálculos:

La cantidad de azúcar ($A_{\text{azúcar}}$, en nmol) absorbida durante el tiempo de incubación (t, en segundos) a una cierta concentración de azúcar (S, en mM):

$$A_{\text{azúcar}} = ((\text{cpm}_{\text{muestra}} - \text{cpm}_{\text{blanco}})/(\text{cpm}_{\text{total}}/10)) \cdot S \cdot 100 \mu\text{l}$$

Velocidad de transporte (en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{ww}}^{-1}$) calculada por miligramos de célula (m, en mg_{ww}):

$$V = (A_{\text{azúcar}}/60 \text{ s})/(t \cdot m)$$

El cálculo de K_m (constante de Michaelis), V_{max} (velocidad de absorción inicial máxima) y K_i (constante del inhibidor para la inhibición competitiva) se realizó mediante análisis de regresión no lineal y ajuste de curva global en Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) con valores de tres mediciones independientes.

Procedimientos bioinformáticos

Las secuencias de ADN se obtuvieron de la base de datos del genoma de *Saccharomyces* (SGD, (Cherry *et al.*, 2012)). Las alineaciones de secuencia para las proteínas transportadoras se realizaron utilizando el servidor de alineación múltiple PRALINE ((Simossis y Heringa, 2005)) con configuraciones estándar más la predicción de la estructura transmembrana de PHOBIUS (Käll *et al.*, 2004). Los árboles filogenéticos se calcularon a partir de las alineaciones PRALINE con la filogenia ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) y se visualizaron con el software PhyloDendron (<http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/java/apps/trees/>). Las similitudes e identidades entre las secuencias de proteínas se calcularon a partir de las alineaciones de PRALINE utilizando SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>). Las figuras para alineaciones de secuencias se crearon con el software ALINE (Bond y Schuttelkopf, 2009).

Ejemplo 1 T354A

1.1 Investigación de Gal2_T354A

El Ethanol Red es una cepa industrial, que es un candidato prometedor para las fermentaciones de hidrolizados lignocelulósicos. Los genes que codifican enzimas para la vía metabólica de xilosa y arabinosa podrían integrarse en el genoma, dando como resultado la cepa HDY.GUF5 (Demeke *et al.*, 2013). HDY.GUF5 se desarrolló más a fondo en xilosa y se manipuló mediante manipulación genética, lo que finalmente dio como resultado la cepa HDY.GUF9 (Dietz 2013). HDY.GUF9 fue evolucionado aún más por la manipulación evolutiva en arabinosa, dando como resultado la cepa HDY.GUF10. Esta cepa también tuvo un comportamiento de crecimiento mejorado en la xilosa. La tasa de consumo de xilosa mejoró en aproximadamente un 80 %, y la tasa de consumo de arabinosa en aproximadamente un 25 %. La determinación de la tasa de absorción de xilosa con los ensayos de absorción de azúcar radiactivos reveló que HDY.GUF10 tenía una tasa de absorción de xilosa 35 % mayor que la de HDY.GUF9. Dado que Gal2 es el único transportador en *S. cerevisiae* que puede transportar xilosa y arabinosa en cantidades significativas, se aisló el gen GAL2 de ambas cepas y se secuenció. Se encontró una sustitución de aminoácidos en Gal2_HDY.GUF10 en comparación con Gal2_HDY.GUF9, que es T354A, probablemente ubicado dentro del canal de transporte en la hélice transmembrana 7 en el lado extracelular. Esta posición puede desempeñar un papel para la alteración de la conformación del transportador. La secuencia deseada se amplificó a partir del ADN cromosómico de HDY.GUF10 y se clonó en p426 para investigar el Gal2p modificado. Como control se utilizó Gal2p de Ethanol Red. Los vectores recibidos se transformaron en las cepas de evaluación para probar el crecimiento en varios medios.

1.2 Prueba para la funcionalidad de Gal2_T354A

Primero se realizó una prueba de crecimiento con los vectores en VW4000 en medios de glucosa y maltosa. El transportador de galactosa de tipo salvaje CEN.PK2, así como Gal2_ep3.1 se utilizaron como controles y como

comparación. El tipo salvaje Gal2p de la cepa industrial Ethanol Red mostró el mismo crecimiento que el tipo salvaje de CEN.PK2, como se esperaba. El crecimiento de Gal2_GUF10 fue similar al crecimiento de ambos tipos salvajes en galactosa, mientras que el crecimiento en glucosa se parecía al crecimiento del mutante propenso a error (Figura 1).

5 Además, esto también se hizo con AFY10 para investigar la especificidad de la xilosa y la afinidad a la glucosa de los transformantes. El Gal2_EtOH Red de tipo salvaje no fue capaz de crecer en una concentración baja de xilosa, como 0,2 %. Sin embargo, se observó el crecimiento de Gal2_GUF10 en este medio. Aún así, el crecimiento de Gal2_GUF10 fue inferior a Gal2_ep3.1 en xilosa al 2 %. Por lo tanto, Gal2_GUF10 parece tener una mayor afinidad por la xilosa. En el medio con glucosa adicional, solo el mutante propenso a error mostró crecimiento (Figura 2).

10 **Ejemplo 2 T354A/V71I**

2.1 Efecto de T354A en combinación con otras mutaciones

El intercambio de aminoácidos T354A en Gal2 se encontró en la cepa Ethanol Red HDY.GUF10 que se desarrolló en arabinosa originada de la cepa HDY.GUF9. Esto indica que se mejoraron las propiedades de transporte de Gal2 para arabinosa. También se demostró que la mutación T354A en Gal2 de HDY.GUF10 podría restaurar el crecimiento en concentraciones bajas de xilosa. La secuencia de Ethanol Red Gal2 y Gal2_HDY.GUF9 difiere en dos aminoácidos de Gal2 de la cepa CEN.PK (L280R y V71I). Para determinar los efectos de estas dos diferencias, se realizaron constructos de expresión de plásmidos con Gal2 de CEN.PK que tienen V71I y L280R solo o en combinación con T354A. Para determinar sus propiedades, se realizaron pruebas de goteo de crecimiento después de la transformación de los constructos con las cepas de cribado EBV.VW4000 y AFY10. Como controles, se usaron CEN.PK Gal2 de tipo salvaje, vector p426_vector vacío y T354A solo en CEN.PK Gal2.

2.2 Crecimiento de células con Gal2_T354A en combinación con L280R y V71I en hexosas

Las siguientes variantes de Gal2 se construyeron en vectores de expresión: T354A, T354A+V71I, T354A+L280R, L280R e I71V. Fueron transformados en células EBV.VW4000 competentes. Luego se realizaron pruebas de goteo en diferentes fuentes de carbono.

25 Como se puede ver (Figura 3), los V71I y L280R por sí solos no tienen efecto en la absorción de glucosa o galactosa. El T354A por sí solo afecta fuertemente el crecimiento de la glucosa. La combinación de V71I y T354A no media crecimiento en glucosa. Sin embargo, la combinación de T354A y L280R puede mediar el crecimiento en glucosa. Sin embargo, el crecimiento es más lento que con Gal2 de tipo salvaje.

2.3 Crecimiento de células con Gal2_T354A en combinación con L280R y V71I en xilosa y mezclas de azúcar

30 Los diversos constructos se transformaron en células AFY10 junto con el vector YEp181_pHXT7-optXI_Clos, y se realizaron pruebas de goteo de crecimiento de dilución en serie.

Ninguna variante puede mediar el crecimiento en las placas de mezcla de xilosa-glucosa, lo que indica que todos los transportadores mutantes están inhibidos por la glucosa. El crecimiento con altas concentraciones de xilosa (20 g/l) no es muy diferente entre los diversos constructos. Sin embargo, el crecimiento en bajas concentraciones de xilosa (2 g/l) muestra diferencias significativas: L280R media el crecimiento como Gal2 de tipo salvaje; el crecimiento de la combinación de L280R y T354A se parece a T354A por sí solo o al control de vector vacío. V71I media un crecimiento muy lento en 2 g/l de xilosa. Sin embargo, la combinación de V71I y T354A media el crecimiento como el Gal2 tipo salvaje (Figura 4), mientras que, en contraste, T354A y V71I por sí solos median un crecimiento pobre en bajas concentraciones de xilosa. Esto demuestra que el intercambio de aminoácidos V71I en Gal2 de Ethanol Red es responsable de la baja actividad de absorción de xilosa, especialmente a bajas concentraciones de xilosa. Este defecto es suprimido por el intercambio adicional de T354A. Esto explica el comportamiento de crecimiento mejorado de GUF-10 en comparación con GUF-9. Como GUF-10 se desarrolló en un medio de arabinosa, se puede concluir que también la absorción de arabinosa de Gal2 a partir de Ethanol Red mejora con la mutación T354A al suprimir el intercambio de V71I.

45 Las características divulgadas en la descripción anterior, en las reivindicaciones y/o en los dibujos adjuntos pueden ser, por separado y en cualquier combinación de estos, material para realizar la invención en diversas formas de estos.

Referencias

- 50 Becker, J. and Boles, E. (2003) A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-Arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol* 69(7),4144-50.
- Brat D, Boles E, Wiedemann B (2009) Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 75:2304-11.
- Bruder S (2011) Analyse eines unbekanntes Glukose Transporters in *Saccharomyces cerevisiae* und Entwicklung eines Xylose-Transporter Screening Systems. Diploma thesis (Goethe Universität Frankfurt).

- Demeke MM, Dietz H, Li Y, Foulquié-Moreno MR, Mutturi S, Deprez S, Den Abt T, Bonini BM, Liden G, Dumortier F, Verplaetse A, Boles E, Thevelein JM (2013) Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol Biofuels*. 6:89.
- 5 Dien, B.S., Kurtzman, C.P., Saha, B.C. and Bothast, R.J. (1996) Screening for L-arabinose fermenting yeasts. *Appl Biochem Biotechnol* 57-58, 233-42.
- Dietz H (2013) Konstruktion und Charakterisierung von pentosefermentierenden Industriehefestämmen. PhD thesis. Goethe University Frankfurt, Germany
- 10 Farwick A, Bruder S, Schadoweg V, Oreb M, Boles E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 8;111(14):5159-64.
- Hahn-Hagerdal, B., Wahlbom, C.F., Gardonyi, M., van Zyl, W.H., Cordero Otero, R.R. and Jonsson, L.J. (2001) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 73,53-84.
- 15 Horak J and Wolf DH (1997) Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J Bacteriol* 179(5):1541-1549.
- Jeppson M, Bengtsson O, Franke K, Lee H, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. (2006) The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K(M) for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 93(4):665-73.
- 20 Jin YS, Jeffries TW. (2004) Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 6(3):229-38.
- Katahira S, Mizuike A, Fukuda H, Kondo A. (2006) Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and celooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72(6):1136-43.
- 25 Kotter, P. and Ciriacy, M. (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 776-783.
- Kou, S.C., Christensen, M.S. and Cirillo, V.P. (1970) Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Characteristics of galactose uptake and exchange in galactokinaseless cells. *J Bacteriol* 103(3), 671-8.
- 30 Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (2005b) Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res* 5(10), 925-34.
- Kuyper, M., Winkler, A.A., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (2004) Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Res* 4(6), 655-64.
- 35 Lucas, C. and Uden, N.v. (1986) Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23,491-495.
- Pitkanen JP, Rintala E, Aristidou A, Ruohonen L, Penttila M. (2005) Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 67(6):827-37.
- 40 Reifenberger E, Boles E and Ciriacy M (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem* 245(2):324-333.
- Richard, P., Putkonen, M., Vaananen, R., Londesborough, J. and Penttila, M. (2002) The missing link in the fungal L-arabinose catabolic pathway, identification of the L-xylose reductase gene. *Biochemistry* 41(20), 6432-7.
- 45 Sambrook J. and Russell D.W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor.
- Subtil T and Boles E (2012) Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 5(1): 14.

Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. and Boles, E. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 464(3), 123-8.

5 Wiedemann B., Boles E. (2008) Codon-optimized bacterial genes improve L-Arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol. 74 (7):2043-50.

Listado de secuencias

<110> Butalco GmbH

<120> Variantes del transportador Gal2 y sus usos

<130> U30698WO

10 <150> EP 14 189 927.8

<151> 2014-10-22

<160> 7

<170> versión de PatentIn 3.5

<210> 1

15 <211> 574

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

ES 2 741 836 T3

Met Ala Val Glu Glu Asn Asn Met Pro Val Val Ser Gln Gln Pro Gln
 1 5 10 15

Ala Gly Glu Asp Val Ile Ser Ser Leu Ser Lys Asp Ser His Leu Ser
 20 25 30

Ala Gln Ser Gln Lys Tyr Ser Asn Asp Glu Leu Lys Ala Gly Glu Ser
 35 40 45

Gly Pro Glu Gly Ser Gln Ser Val Pro Ile Glu Ile Pro Lys Lys Pro
 50 55 60

Met Ser Glu Tyr Val Thr Val Ser Leu Leu Cys Leu Cys Val Ala Phe
 65 70 75 80

Gly Gly Phe Met Phe Gly Trp Asp Thr Gly Thr Ile Ser Gly Phe Val
 85 90 95

Val Gln Thr Asp Phe Leu Arg Arg Phe Gly Met Lys His Lys Asp Gly
 100 105 110

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

Asn Ile Gly Cys Ala Phe Gly Gly Ile Ile Leu Ser Lys Gly Gly Asp
 130 135 140

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Gly Leu Ser Ile Val Val Ser Val Tyr Ile
 145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ile Gln Ile Ala Ser Ile Asn Lys Trp Tyr Gln Tyr

ES 2 741 836 T3

				165					170					175			
Phe	Ile	Gly	Arg	Ile	Ile	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Gly	Ile	Ala	Val		
			180					185					190				
Leu	Cys	Pro	Met	Leu	Ile	Ser	Glu	Ile	Ala	Pro	Lys	His	Leu	Arg	Gly		
		195					200					205					
Thr	Leu	Val	Ser	Cys	Tyr	Gln	Leu	Met	Ile	Thr	Ala	Gly	Ile	Phe	Leu		
	210					215					220						
Gly	Tyr	Cys	Thr	Asn	Tyr	Gly	Thr	Lys	Ser	Tyr	Ser	Asn	Ser	Val	Gln		
225					230					235					240		
Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Cys	Phe	Ala	Trp	Ser	Leu	Phe	Met	Ile		
				245					250					255			
Gly	Ala	Leu	Thr	Leu	Val	Pro	Glu	Ser	Pro	Arg	Tyr	Leu	Cys	Glu	Val		
			260					265					270				
Asn	Lys	Val	Glu	Asp	Ala	Lys	Leu	Ser	Ile	Ala	Lys	Ser	Asn	Lys	Val		
		275					280					285					
Ser	Pro	Glu	Asp	Pro	Ala	Val	Gln	Ala	Glu	Leu	Asp	Leu	Ile	Met	Ala		
	290					295					300						
Gly	Ile	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Ser	Trp	Gly	Glu	Leu		
305					310					315					320		
Phe	Ser	Thr	Lys	Thr	Lys	Val	Phe	Gln	Arg	Leu	Leu	Met	Gly	Val	Phe		
				325					330					335			
Val	Gln	Met	Phe	Gln	Gln	Leu	Thr	Gly	Asn	Asn	Tyr	Phe	Phe	Tyr	Tyr		
			340					345					350				
Gly	Thr	Val	Ile	Phe	Lys	Ser	Val	Gly	Leu	Asp	Asp	Ser	Phe	Glu	Thr		
		355					360					365					
Ser	Ile	Val	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Phe	Ala	Ser	Thr	Phe	Phe	Ser	Leu		
	370					375					380						
Trp	Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Lys	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala		
385					390					395					400		
Ala	Thr	Met	Met	Ala	Cys	Met	Val	Ile	Tyr	Ala	Ser	Val	Gly	Val	Thr		
				405					410					415			

ES 2 741 836 T3

Arg Leu Tyr Pro His Gly Lys Ser Gln Pro Ser Ser Lys Gly Ala Gly
 420 425 430

Asn Cys Met Ile Val Phe Thr Cys Phe Tyr Ile Phe Cys Tyr Ala Thr
 435 440 445

Thr Trp Ala Pro Val Ala Trp Val Ile Thr Ala Glu Ser Phe Pro Leu
 450 455 460

Arg Val Lys Ser Lys Cys Met Ala Leu Ala Ser Ala Ser Asn Trp Val
 465 470 475 480

Trp Gly Phe Leu Ile Ala Phe Phe Thr Pro Phe Ile Thr Ser Ala Ile
 485 490 495

Asn Phe Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Met Gly Cys Leu Val Ala Met Phe
 500 505 510

Phe Tyr Val Phe Phe Phe Val Pro Glu Thr Lys Gly Leu Ser Leu Glu
 515 520 525

Glu Ile Gln Glu Leu Trp Glu Glu Gly Val Leu Pro Trp Lys Ser Glu
 530 535 540

Gly Trp Ile Pro Ser Ser Arg Arg Gly Asn Asn Tyr Asp Leu Glu Asp
 545 550 555 560

Leu Gln His Asp Asp Lys Pro Trp Tyr Lys Ala Met Leu Glu
 565 570

<210> 2

<211> 59

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 2

aacacaaaaa caaaaagttt ttttaatttt aatcaaaaaa tggcagttga ggagaacaa 59

10 <210> 3

<211> 60

<212> ADN

ES 2 741 836 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 3
5 gaatgtaagc gtagacataac taattacatg actcgagtta ttctagcatg gccttgacc 60
<210> 4
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Cebador
<400> 4
ttatttttc tactacggtg ccgttatatt caagtcag 38
<210> 5
15 <211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
20 <400> 5
gactgaaaa taacggcacc gtagtagaaa aaataattg 39
<210> 6
<211> 36
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 6
gtctgaatat gttaccattt ccttgcttg tttgtg 36
30 <210> 7
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> Cebador
<400> 7
aaacaaagca aggaaatggt aacatattca gacatg 36

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido, que comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a T354 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,
- 5 en el que el polipéptido tiene al menos 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y en el que el polipéptido tiene una función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo*.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido es Gal2 de *Saccharomyces cerevisiae*.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a T354 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 es T354A.
- 10 4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una sustitución de aminoácidos adicional en una posición correspondiente a V71 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, tal como la sustitución de aminoácidos V71I.
5. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a T354 aumenta la actividad de la función de transporte de pentosa *in vitro* y/o *in vivo* en comparación con el polipéptido sin tal sustitución de aminoácido.
- 15 6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la sustitución o sustituciones de aminoácidos en una posición correspondiente a T354 aumenta la afinidad del polipéptido para pentosa o pentosas en comparación con el polipéptido sin dicha sustitución de aminoácido.
7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la pentosa es D-xilosa y/o L-arabinosa.
- 20 8. Una molécula de ácido nucleico, que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, que comprende además secuencias vector de ácido nucleico, preferiblemente secuencias vector de expresión, y/o que comprende secuencias promotoras de ácido nucleico y secuencias terminadoras de ácido nucleico y/o que comprende otras secuencias reguladoras de ácido nucleico
- 25 y/o en el que la molécula de ácido nucleico comprende ADNds, ADNss, PNA, CNA, ARN o ARNm o combinaciones de estos.
10. Célula huésped, que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 y que expresa preferiblemente dicha molécula de ácido nucleico, en la que dicha célula huésped es preferiblemente una célula de hongo y más preferiblemente una célula de levadura, tal como la especie de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* sp., *Hansenula* sp., *Pichia* sp. o *Yarrowia* sp, en la que preferiblemente la célula huésped pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30 11. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10, que tiene una tasa de absorción aumentada para D-xilosa y/o L-arabinosa en comparación con una célula que no contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.
- 35 12. La célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, que contiene además
- moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas de una vía metabólica de xilosa (preferiblemente xilosa isomerasa y xiluloquinasa),
- y/o
- moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas de una vía metabólica de arabinosa (preferiblemente arabinosa isomerasa, ribuloquinasa, ribulosa-5-P 4-epimerasa), en la que, preferiblemente, la célula huésped tiene una mayor tasa de consumo de D-xilosa y/o L-arabinosa y/o una tasa de crecimiento más rápida con D-xilosa y/o L-arabinosa en comparación con una célula que no contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.
- 40
13. Procedimiento para la producción de bioetanol y/u otros compuestos de base biológica, que comprende la expresión de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, preferiblemente en una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
- 45
14. Uso de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, o una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para la producción de bioetanol y/u otros compuestos de base biológica y/o para la

fermentación recombinante de biomaterial que contiene pentosa o pentosas, preferiblemente D-xilosa y/o L-arabinosa.

15. El procedimiento de la reivindicación 13 o el uso de la reivindicación 14, en el que los otros compuestos de base biológica se seleccionan de

5 1-butanol, isobutanol, 2-butanol, otros alcoholes,

ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, otros ácidos orgánicos

aminoácidos, alcanos, terpenos, isoprenoides, disolventes, compuestos farmacéuticos, vitaminas.

Figura 1

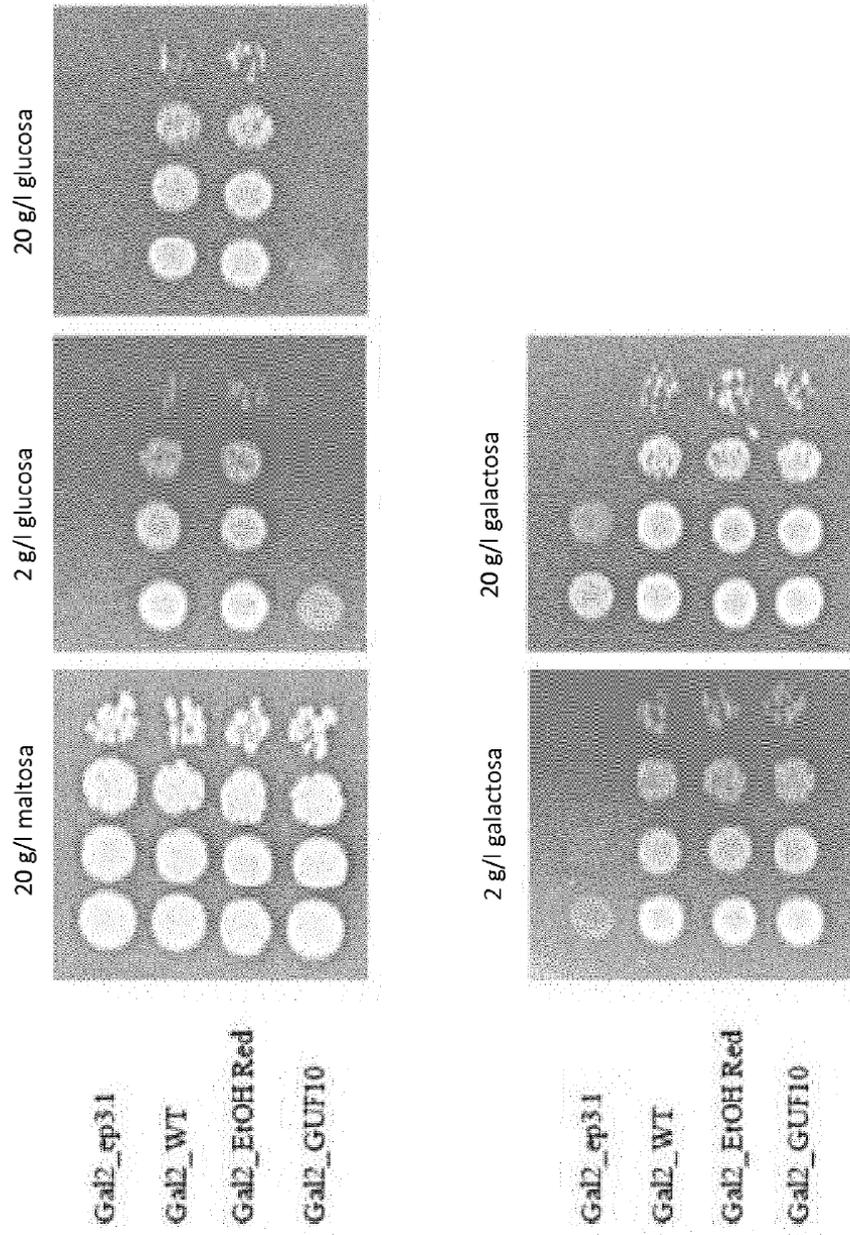


Figura 2

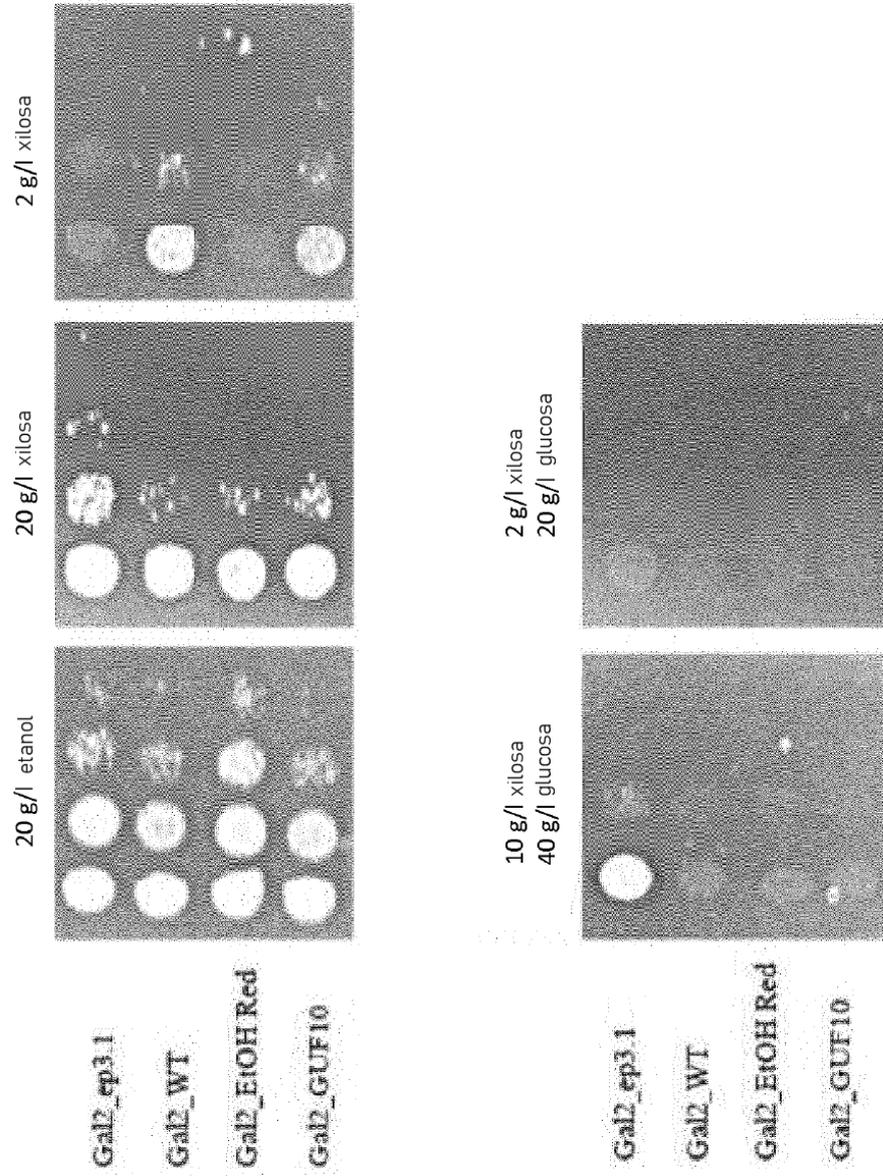


Figura 3

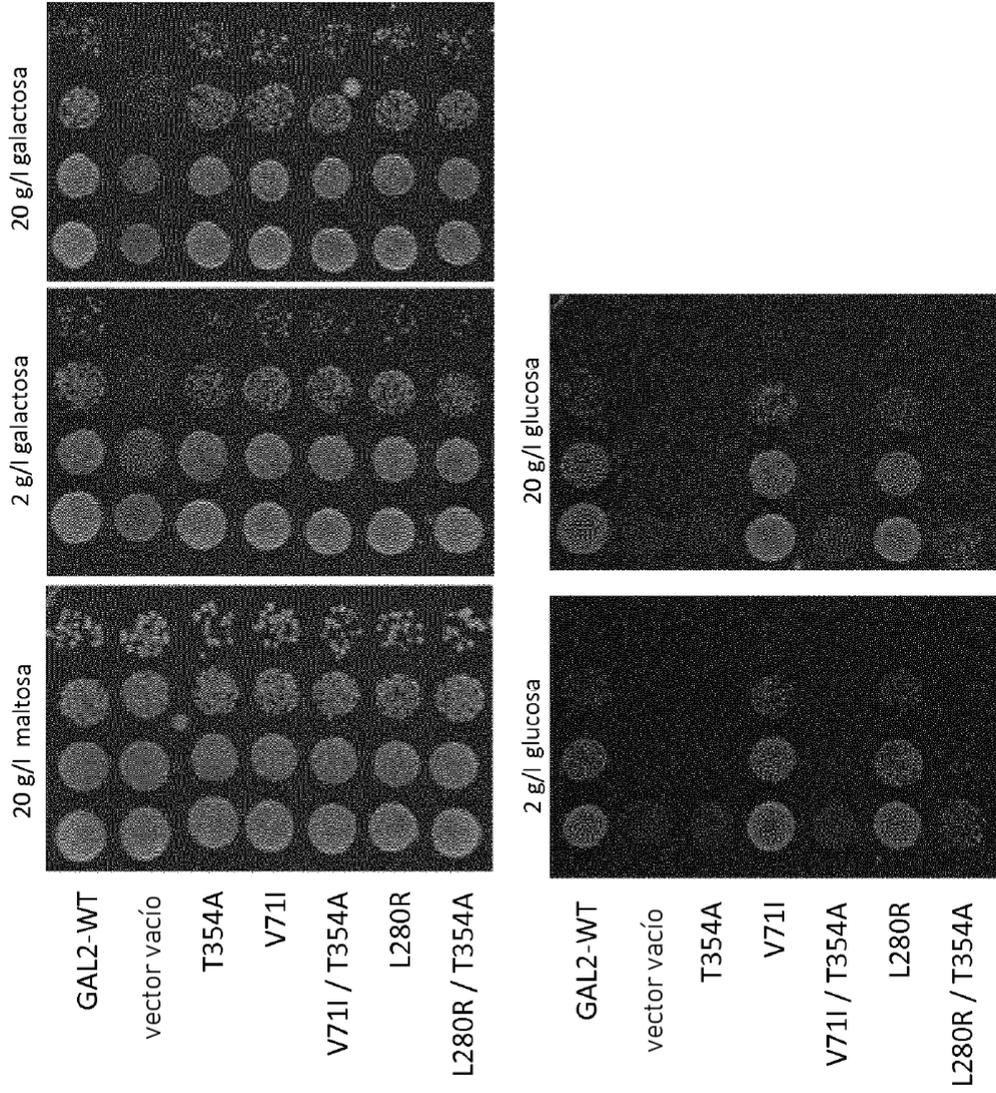


Figura 4

