(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Januar 2010 (07.01.2010)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/000464 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 5/10 (2006.01) *C12R 1/645* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) *C12N 9/92* (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01) *C12P 19/24* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/004762

(22) Internationales Anmeldedatum:
1. Juli 2009 (01.07.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 031 350.5 2. Juli 2008 (02.07.2008) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN** [DE/DE]; Senckenberganlage 31, 60325 Frankfurt am Main (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **BRAT, Dawid** [DE/DE]; Toni-Sender-Strasse 9, 65936 Frankfurt (DE). **BOLES, Eckhard** [DE/DE]; Liebigstrasse 65, 64293 Darmstadt (DE). **KELLER, Marco** [DE/DE]; Mörlheimer Str. 17, 76879 Bornheim (DE). **WIEDEMANN, Beate** [DE/DE]; Schwarzburgstrasse 58, 60318 Frankfurt (DE).

(74) Anwälte: **GRAHN, Sibylla, M.** et al.; Boehmert & Boehmert, Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*

— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

(54) Title: PROKARYOTIC XYLOSE ISOMERASE FOR THE CONSTRUCTION OF XYLOSE FERMENTING YEASTS

(54) Bezeichnung: PROKARYOTISCHE XYLOSE-ISOMERASE ZUR KONSTRUKTION XYLOSE-VERGÄRENDER HEFEN

(57) Abstract: The present invention relates to the use of nucleic acid molecules coding for a bacterial xylose isomerase (XI), preferably coming from *Clostridium phytofermentans*, for reaction/metabolization, particularly fermentation, of recombinant microorganisms of biomaterial containing xylose, and particularly for the production of bioalcohols, particularly bioethanol, by means of xylose fermenting yeasts. The present invention further relates to cells, particularly eukaryotic cells, which are transformed utilizing a nucleic acid expression construct which codes for a xylose isomerase, wherein the expression of the nucleic acid expression construct imparts to the cells the capability to directly isomerize xylose into xylulose. Said cells are preferably utilized for reaction/metabolization, particularly fermentation, of biomaterial containing xylose, and particularly for the production of bioalcohols, particularly bioethanol. The present invention also relates to methods for the production of bioethanol, and to methods for the production of further metabolization products, comprising the metabolization of media containing xylose.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Nukleinsäuremolekülen, die für eine bakterielle Xylose-Isomerase (XI) kodieren, die bevorzugt von *Clostridium phytofermentans* stammt, für die Umsetzung/Verstoffwechselung, dabei insbesondere Fermentation, mit rekombinanten Mikroorganismen von Xylose-haltigem Biomaterial und insbesondere die Herstellung von Bioalkoholen, dabei insbesondere Bioethanol, mittels Xylose-vergärender Hefen. Die vorliegende Erfindung bezieht sich weiterhin auf Zellen, insbesondere eukaryotische Zellen, die mit einem Nukleinsäure-Expressionskonstrukt, das eine Xylose-Isomerase (XI) kodiert, transformiert sind, wobei die Expression des Nukleinsäure- Expressionskonstrukts den Zellen die Fähigkeit verleiht, Xylose direkt zu Xylulose zu isomerisieren. Diese Zellen werden bevorzugt zur Umsetzung/Verstoffwechselung, dabei insbesondere Fermentation, von Xylose-haltigem Biomaterial und insbesondere zur Herstellung von Bioalkoholen, dabei insbesondere Bioethanol, verwendet. Die vorliegende Erfindung bezieht sich weiterhin auf Verfahren zur Produktion von Bioethanol und auf Verfahren zur Produktion von weiteren Verstoffwechselungsprodukten, umfassend die Verstoffwechselung von Medien, die Xylose enthalten.

WO 2010/000464 A1

Prokaryotische Xylose-Isomerase zur Konstruktion Xylose-vergärender Hefen

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Nukleinsäuremolekülen, die für eine bakterielle Xylose-Isomerase (XI) kodieren, die bevorzugt von *Clostridium phytofermentans* stammt, für die Umsetzung/Verstoffwechselung, dabei insbesondere Fermentation, mit rekombinanten Mikroorganismen von Xylose-haltigem Biomaterial und insbesondere die Herstellung von Bioalkoholen, dabei insbesondere Bioethanol, mittels Xylose-vergärender Hefen. Die vorliegende Erfindung bezieht sich weiterhin auf Zellen, insbesondere eukaryotische Zellen, die mit einem Nukleinsäure-Expressionskonstrukt, das eine Xylose-Isomerase (XI) kodiert, transformiert sind, wobei die Expression des Nukleinsäure-Expressionskonstrukts den Zellen die Fähigkeit verleiht, Xylose direkt zu Xylulose zu isomerisieren. Diese Zellen werden bevorzugt zur Umsetzung/Verstoffwechselung, dabei insbesondere Fermentation, von Xylose-haltigem Biomaterial und insbesondere zur Herstellung von Bioalkoholen, dabei insbesondere Bioethanol, verwendet. Die vorliegende Erfindung bezieht sich weiterhin auf Verfahren zur Produktion von Bioethanol und auf Verfahren zur Produktion von weiteren Verstoffwechselungsprodukten, umfassend die Verstoffwechselung von Medien, die Xylose enthalten.

Hintergrund der Erfindung

Die Bier-, Wein- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird aufgrund ihrer Eigenschaft, Zucker zu Ethanol und Kohlendioxid zu fermentieren, schon seit Jahrhunderten für die Brot-, Wein- und Bierherstellung genutzt. In der Biotechnologie findet *S. cerevisiae* neben der Produktion von heterologen Proteinen vor allem in der Ethanolproduktion für industrielle Zwecke Verwendung. Ethanol wird in zahlreichen Industriezweigen als Ausgangssubstrat für Synthesen benutzt. Durch die immer knapper werdenden Ölvorkommen, die steigenden Ölpreise und den stetig steigenden weltweiten Benzinbedarf gewinnt Ethanol als Kraftstoffalternative mehr und mehr an Bedeutung.

Um eine kostengünstige und effiziente Bioethanol-Produktion zu ermöglichen bietet sich die Verwendung von lignozellulosehaltiger Biomasse, wie z.B. Stroh, Abfälle aus der Holz- und Landwirtschaft und der organische Anteil aus dem alltäglichen Hausmüll, als Ausgangssubstrat an. Diese ist zum einen sehr günstig und zum anderen in großer Menge vorhanden. Die drei größten Bestandteile der Lignozellulose sind Lignin, Zellulose und Hemizellulose. Hemizellulose, nach Zellulose das am zweithäufigsten vorkommende Polymer, ist ein stark verzweigtes Heteropolymer. Es besteht aus Pentosen (L-Arabinose, D-Xylose), Uronsäuren (4-O-Methyl-D-Glucuronsäure, D-Galacturonsäure) und Hexosen (D-Mannose, D-Galactose, L-Rhamnose, D-Glucose) (siehe Figur 1). Hemizellulose lässt sich zwar leichter als Zellulose hydrolysieren, besitzt aber die Pentosen L-Arabinose und D-Xylose, die von der Hefe *S. cerevisiae* normalerweise nicht umgesetzt werden können.

Um Pentosen für Fermentationen nutzen zu können, müssen diese zuerst über die Plasmamembran in die Zelle hinein gelangen. Obwohl *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist, D-Xylose zu metabolisieren, kann es diese in die Zelle aufnehmen. *S. cerevisiae* besitzt aber keine spezifischen Transporter. Der Transport findet mit Hilfe der zahlreichen Hexosetransporter statt. Die Affinität der Transporter zu D-Xylose ist aber deutlich niedriger als die zu D-Glucose (Kotter und Ciriacy, 1993). In Hefen, die D-Xylose metabolisieren können, wie z.B. *P. stipitis*, *C. shehatae* oder *P. tannophilus* (Du Preez et al., 1986), gibt es sowohl unspezifische niederaffine Transporter, die D-Glucose transportieren, als auch spezifische hochaffine Protonen-Symporter nur für D-Xylose (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2001).

Verwertung von D-Xylose

Verschiedene Bakterien, Hefen und Pilze sind in der Lage, Xylose zu verstoffwechseln. Die Verstoffwechselung von Xylose unterscheidet sich bei Pro- und Eukaryonten hauptsächlich in der Art der Isomerisierung der Xylose zu Xylulose. In Prokaryonten erfolgt die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch das Enzym Xylose-Isomerase (XI). In Eukaryonten wird Xylose meist in zwei Schritten isomerisiert. Zuerst wird Xylose durch die NAD(P)H-abhängige Xylose-Reduktase (XR) zu Xylitol reduziert und weiter durch die NAD-abhängige Xylitol-Dehydrogenase (XDH) zu Xylulose umgesetzt. Die anschließende Phosphorylierungsreaktion erfolgt in Pro- und Eukaryonten durch die Xylulokinase (XK).

Das entstandene Intermediat Xylulose-5-Phosphat ist ein Intermediat des Pentosephosphatweges. Der Hauptteil des Xylulose-5-Phosphats gelangt in Form von

Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat in die Glykolyse und wird dort weiter zu Pyruvat umgesetzt (Schaaff-Gerstenschläger und Miosga, 1997). Unter fermentativen Bedingungen wird der Zucker durch die Pyruvat-Decarboxylase und durch die Alkohol-Dehydrogenase weiter zu Ethanol abgebaut. Unter aeroben Bedingungen kann Pyruvat im Citratzyklus über eine Reihe von Reaktionsschritten bis zum Kohlendioxid oxidiert werden.

Verwertung von D-Xylose in S. cerevisiae

In Arbeiten von Kötter und Ciriacy (1993) wurde erstmals ein rekombinanter *S. cerevisiae* Stamm konstruiert, der in der Lage war, D-Xylose zu metabolisieren. Hierfür wurden die für D-Xylose Reduktase (*XYL1*) und Xylitol Dehydrogenase (*XYL2*) kodierenden Gene der Hefe *Pichia stipitis* heterolog in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert. In späteren Arbeiten wurde zusätzlich die endogene Xylulokinase (*XKS1*) überexprimiert, was die D-Xylose Aufnahme in die Zelle sowie deren Umsetzung zu Ethanol verbesserte (Ho *et al.*, 1998; Eliasson *et al.*, 2000). Trotz der erzielten Verbesserungen war unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen das Hauptnebenprodukt der Xyloseumsetzung Xylitol. Dies wird einem Ungleichgewicht in der Redoxbalance zugeschrieben, welches dadurch verursacht wird, dass die in dem Stoffwechselweg zuerst ablaufende Reaktion bevorzugt NADPH nutzt, die zweite Reaktion jedoch ausschließlich NADH produziert (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Unter aeroben Bedingungen kann das durch die Xylitol-Dehydrogenase gebildete NADH über die Atmungskette zu NAD regeneriert werden. Unter anaeroben Bedingungen kann NAD nicht regeneriert werden und es kommt zu einer Ansammlung von NADH in der Zelle. Ohne den Cofaktor NAD kann die Xylitol-Dehydrogenase Xylitol nicht weiter zu Xylulose umsetzen.

Obwohl die in der genannten Arbeit verwendete Xylose-Reduktase aus *P. stipitis* stammt, welche in der Lage ist neben NADPH auch NADH als Cofaktor zu nutzen (Metzger und Hollenberg, 1995), kommt es unter strikt anaeroben Bedingungen zum Erliegen der Xylosefermentation.

Eine Lösung des Problems bestand darin, einen redoxneutralen Stoffwechselweg in *S. cerevisiae* einzuführen. In Prokaryonten erfolgt die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch das Enzym Xylose-Isomerase (XI). Für eine vollständige Umsetzung der D-Xylose müsste in *S. cerevisiae* zusätzlich nur das Gen *XI* exprimiert werden, da eine endogene Xylulokinase vorhanden ist. Obwohl eine Xylose-Isomerase in manchen Pilzen nachgewiesen werden konnte (Tomoyeda und Horitsu, 1964; Vongsuvanglert und Tani, 1988; Banerjee *et al.*, 1994;

Rawat *et al.*, 1996), war in Eukaryonten nur der Xylose-Abbau über die Enzyme Xylose-Reduktase und Xylitol-Dehydrogenase gezeigt worden. Viele Bemühungen, eine Xylose-Isomerase aus unterschiedlichen Organismen in Hefe heterolog zu exprimieren, schlugen fehl (Gárdonyi und Hahn-Hägerdal, 1993). Meistens waren die Enzyme in Hefe nicht funktionell oder sie wurden nicht zu Proteinen synthetisiert (Sarthy *et al.*, 1987; Amore *et al.*, 1989; Moes *et al.*, 1996). Mit hoher Aktivität konnte nur die Xylose-Isomerase aus dem obligat anaeroben Pilz *Piromyces* sp. E2 (Kyper *et al.*, 2003) in Hefe exprimiert werden. Bei heterologer Überexpression dieser eukaryotischen Xylose-Isomerase (Harhangi *et al.*, 2003) war *S. cerevisiae* in der Lage, auf Xylose zu wachsen und es auch unter anaeroben Bedingungen zu metabolisieren (Kuyper *et al.*, 2003). Weitere Tests zeigten allerdings, dass das Enzym durch Xylitol, ein Produkt der Xylose-Umsetzung, stark gehemmt wird. Xylitol wird in Hefe unspezifisch aus Xylose mittels Aldose-Reduktasen gebildet.

US 6,475,768 beschreibt die Verwendung einer prokaryotischen thermophilen Xylose-Isomerase aus *Thermus thermophilus* bzw. Varianten von dieser für die Metabolisierung von Xylose durch Hefen. Das Temperaturoptimum dieses Enzyms bzw. der Varianten liegt bei einer Temperatur (>70°C), die deutlich über der Temperatur liegt, bei der Hefe wächst und metabolisiert (28-35°C), bei Temperaturen über 40°C ist Hefe jedoch inaktiv bzw. stirbt ab. Bei Temperaturen um 30°C ist die Xylose-Isomerase aus *Thermus thermophilus* bzw. auch die Varianten jedoch nahezu inaktiv. Daher erlaubt auch dieses Enzym bzw. dessen Varianten der Hefe keine effektive Xylose-Metabolisierung.

Es besteht also im Stand der Technik Bedarf für Pentose-Isomerasen, insbesondere Xylose-Isomerasen, die eine verbesserte und effizientere Pentose-Umsetzung, insbesondere Xylose-Umsetzung ermöglichen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, verbesserte Pentose-Isomerasen, insbesondere Xylose-Isomerasen, für die Verwendung bei der Xylose-Umsetzung zur Verfügung zu stellen, die insbesondere für Industriehefestämme verwendet werden können.

Xylose-Isomerase (XI)-Konstrukte und deren Verwendung

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch zur Verfügung stellen eines Nukleinsäuremoleküls, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, für

- die Transformation einer Zelle, bevorzugt für die rekombinante Expression und Herstellung der Xylose-Isomerase,
- die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch die Zelle und/oder
- die Bildung von Folgeprodukten aus Xylose durch die Zelle.

Insbesondere für folgende Verwendungen:

- die Transformation einer Zelle, bevorzugt für die rekombinante Expression/Herstellung der prokaryotischen Xylose-Isomerase,
- die Umsetzung/Verstoffwechselung, dabei insbesondere Fermentation, von Xylose-haltigem Biomaterial,
- die Herstellung von biobasierten Chemikalien,
- die Herstellung von Biobutanol,
- die Herstellung von Bioethanol.

Unter „Folgeprodukten" sollen die Verbindungen verstanden werden, die die Zelle weiter aus der zu Xylulose umgesetzten Xylose produziert, wie beispielsweise biobasierte Chemikalien und Bioalkohole.

Unter „biobasierten Chemikalien" sollen chemische Verbindungen und Stoffe verstanden werden, die aus biologischen Materialien und Rohstoffen (Biomasse) insbesondere unter Verwendung von Mikroorganismen erhalten werden.

Bei den biobasierten Chemikalien kann es sich um eine Verbindung handeln, die ausgewählt ist aus, aber nicht beschränkt ist auf: Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, 1-Butanol, Isobutanol, 2-Butanol, andere Alkohole, Aminosäuren, 1,3-Propandiol, Ethylen, Glycerol, ein β-Lactam-Antibiotikum oder ein Cephalosporin, Alkanen, Terpenen, Isoprenoiden oder dem Vorläufermolekül Amorphadien des Antimalaria-Wirkstoffes Artemisinin.

Die Begriffe „Umsetzung" und „Verstoffwechselung" werden synonym verwendet und bedeuten die Metabolisierung einer Substanz bzw. Umsetzung einer Substanz im Stoffwechsel, hier: die Umsetzung von Xylose, insbesondere die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure transformiert wurde. Eine bevorzugte Umsetzung/Verstoffwechselung ist die Fermentation.

Bei den Nukleinsäuremolekülen handelt es sich um rekombinante Nukleinsäuremoleküle. Des Weiteren umfassen erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle dsDNA, ssDNA, PNA, CNA, RNA oder mRNA oder Kombinationen davon.

Die erfindungsgemäße prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) stammt von *Clostridium phytofermentans*.

In dieser Erfindung ist es mit einem Testsystem gelungen, eine hoch funktionelle prokaryotische Xylose-Isomerase aus *Clostridium phytofermentans* in der Hefe *S. cerevisiae* zu exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die gefundene Xylose-Isomerase rekombinanten Hefen eine effiziente Xylose-Verstoffwechselung ermöglicht.

Die erfindungsgemäße prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kann in Zellen, insbesondere eukaryotischen Zellen in einer aktiven Form exprimiert werden. Außerdem ist die erfindungsgemäße prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) weniger sensitiv gegenüber einer Inhibierung durch Xylitol als die im Stand der Technik bekannte eukaryotische Xylose-Isomerase aus einem anaeroben Fungus.

Wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, die für die prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, in einer Zelle exprimiert wird, dann wird der Zelle die Fähigkeit verliehen, Xylose in Xylulose umzuwandeln, welche dann weiter metabolisiert werden kann. Dadurch ist die Zelle in der Lage, auf Xylose als Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens 70% identisch, bevorzugt mindestens 80% identisch, weiter bevorzugt mindestens 90% identisch, noch weiter bevorzugt mindestens 95% identisch und noch weiter bevorzugt 99% identisch oder identisch zu der Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO. 1 ist.

Die Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, umfasst bevorzugt eine Nukleinsäuresequenz, die zu mindestens 70% identisch, bevorzugt 80% identisch, weiter bevorzugt mindestens 90% identisch, noch weiter bevorzugt mindestens

95% identisch und noch weiter bevorzugt 99% identisch oder identisch zu der Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO. 2 ist.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle umfassen bevorzugt Nukleinsäuresequenzen, die mit der natürlich vorkommenden Nukleinsäuresequenz identisch sind oder für eine Verwendung in einer Wirtszelle Codon-optimiert sind.

Jede Aminosäure wird auf Genebene durch ein Codon verschlüsselt. Jedoch gibt es mehrere verschiedene Codons, die für eine einzelne Aminosäure codieren. Der genetische Code ist folglich degeneriert. Die bevorzugte Codonwahl für eine entsprechende Aminosäure ist von Organismus zu Organismus verschieden. So kann es bei heterolog exprimierten Genen zu Problemen kommen, wenn der Wirtsorganismus bzw. die Wirtszelle einen sehr unterschiedlichen Codon-Gebrauch aufweist. Das Gen kann überhaupt nicht oder nur langsam exprimiert werden. Sogar in Genen von verschiedenen Stoffwechselwegen innerhalb eines Organismus ist ein unterschiedlicher Codon-Gebrauch festzustellen. Von den Glykolyse-Genen aus *S. cerevisiae* ist bekannt, daß sie stark exprimiert werden. Sie weisen einen stark restriktiven Codon-Gebrauch auf. Es ist davon auszugehen, dass durch Anpassung des Codon-Gebrauchs des bakteriellen Xylose-Isomerase-Gens an den Codon-Gebrauch der Glykolyse-Gene aus *S. cerevisiae*, es zu einer Verbesserung des Xylose-Umsatzes in Hefe kommt.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, eine Nukleinsäuresequenz, die für die Verwendung in einer Wirtszelle Codon-optimiert ist.
Die Codon-Optimierung besteht im Wesentlichen bevorzugt in einer Anpassung des Codon-Gebrauchs an den Codon-Gebrauch des Wirtsorganismus/Wirtszelle, wie Hefe. Bevorzugt wird der Codon-Gebrauch des bakteriellen Xylose-Isomerase-Gens an den Codon-Gebrauch der Glykolyse-Gene aus *S. cerevisiae* angepasst. Für weitere Details, siehe auch Beispiel 2 und Tabelle 1.

Die Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, umfasst bevorzugt eine Nukleinsäuresequenz, die zu mindestens 70% identisch, bevorzugt 80% identisch, weiter bevorzugt mindestens 90% identisch, noch weiter bevorzugt mindestens 95% identisch und noch weiter bevorzugt 99% identisch oder identisch zu der Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO. 3 ist.

Bevorzugt ist das erfindungsgemäß verwendete Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäure-Expressionskonstrukt.

Nukleinsäure-Expressionskonstrukte gemäß der Erfindung sind beispielsweise Expressionskassetten, umfassend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, oder Expressionsvektoren, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder eine Expressionskassette umfassen.

Bevorzugt umfasst ein Nukleinsäure-Expressionskonstrukt Promotor- und Terminatorsequenzen, wobei der Promotor operativ verbunden ist mit der Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert.

Bevorzugte Promotorsequenzen sind ausgewählt aus HXT7, verkürzter HXT7, PFK1, FBA1, PGK1, ADH1 und TDH3.

Bevorzugte Terminatorsequenzen sind ausgewählt aus CYC1, FBA1, PGK1, PFK1, ADH1 und TDH3.

Das Nukleinsäure-Expressionskonstrukt kann weiterhin 5' und/oder 3' Erkennungssequenzen und/oder Selektionsmarker umfassen.

Bevorzugt wird der Selektionsmarker ausgewählt aus einem LEU2-Markergen, einem URA3-Markergen oder einem dominanten Antibiotika-Resistenz-Markergen. Ein bevorzugter dominantes Antibiotika-Resistenz-Markergen wird ausgewählt aus Genen, die Resistenzen gegenüber Geneticin, Hygromycin und Nourseothricin verleihen.

Ein Expressionsvektor kann ausgewählt werden aus der Gruppe pRS303X, p3RS305X, p3RS306X, pRS41H, pRS41K, pRS41N, pRS42H, pRS42K, pRS42N oder p423HXT7-6HIS, p424HXT7-6HIS, p425HXT7-6HIS, p426HXT7-6HIS.

Bevorzugt ist die zu transformierenden Zelle ein eukaryotischer Mikroorganismus, bevorzugt eine Hefezelle oder eine Fadenpilzzelle.

Die Hefezelle ist bevorzugt ein Mitglied eines Genus ausgewählt aus der Gruppe aus *Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Pichia, Schizosaccharomyces, Hansenula, Kloeckera, Schwanniomyces, Arxula* und *Yarrowia.*

Die Hefezelle ist weiter bevorzugt ein Mitglied einer Species ausgewählt aus der Gruppe aus *S. cerevisiae, S. bulderi, S. barnetti, S. exiguus, S. uvarum, S. diastaticus, K. lactis, K. marxianus* und *K. fragilis.*

Die Fadenpilzzelle ist bevorzugt ein Mitglied eines Genus ausgewählt aus der Gruppe aus *Aspergillus, Trichoderma, Humicola, Acremonium, Fusarium,* und *Penicillium.*

Xylose-vergärende Zellen

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch zur Verfügung stellen Zellen, die mit einem Nukleinsäure-Expressionskonstrukt transformiert sind, das für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert.

Eine erfindungsgemäße Zelle ist bevorzugt eine eukaryotische Zelle.

Eine erfindungsgemäße Zelle, insbesondere eine eukaryotische Zelle, ist mit einem Nukleinsäure-Expressionskonstrukt transformiert, welches umfasst:

(a) eine Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert,

(b) einen operativ mit der Nukleinsäuresequenz verbundenen Promoter, der die Expression der prokaryotischen Xylose-Isomerase (XI) in der Zelle ermöglicht.

Dabei verleiht die Expression des Nukleinsäure-Expressionskonstrukts der Zelle die Fähigkeit, Xylose direkt zu Xylulose zu isomerisieren.

Wie oben diskutiert, kann die erfindungsgemäße prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) in Zellen, insbesondere eukaryotischen Zellen, in einer aktiven Form exprimiert werden, so dass die Zellen somit Xylose direkt zu Xylulose isomerisieren können (siehe auch Figur 2).

Außerdem sind die erfindungsgemäßen prokaryotischen Xylose-Isomerase (XI) weniger sensitiv gegenüber einer Inhibierung durch Xylitol als die im Stand der Technik bekannten eukaryotischen Xylose-Isomerasen aus einem anaeroben Fungus.

Die Erfinder haben einen redoxneutralen Stoffwechselweg in *S. cerevisiae* eingeführt, in dem die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch eine Xylose-Isomerase (XI) erfolgt (Fig. 2).

Wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, die für die prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, in einer Zelle exprimiert wird, dann wird der Zelle die Fähigkeit verliehen, Xylose in Xylulose umzuwandeln, welche dann weiter metabolisiert werden kann. Dadurch ist die Zelle in der Lage, auf Xylose als Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Die erfindungsgemäße prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) stammt bevorzugt aus *Clostridium phytofermentans*. Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Xylose-Isomerase (XI) eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens 70% identisch, bevorzugt mindestens 80% identisch, weiter bevorzugt mindestens 90% identisch, noch weiter bevorzugt mindestens 95% identisch und noch weiter bevorzugt 99% identisch oder identisch zu der Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO. 1 ist.

Der Promotor (b) ist bevorzugt ausgewählt aus HXT7, verkürzter HXT7, PFK1, FBA1, PGK1, ADH1 und TDH3.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Nukleinsäure-Expressionskonstrukt, mit dem eine erfindungsgemäße Zelle transformiert ist, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, wie hierin und oben definiert.

Bevorzugt ist die erfindungsgemäße Zelle ein eukaryotischer Mikroorganismus, bevorzugt eine Hefezelle oder eine Fadenpilzzelle.

Eine erfindungsgemäße Hefezelle ist bevorzugt ein Mitglied eines Genus ausgewählt aus der Gruppe aus *Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Pichia, Schizosaccharomyces, Hansenula, Kloeckera, Schwanniomyces, Arxula* und *Yarrowia*.

Eine erfindungsgemäße Hefezelle ist weiter bevorzugt ein Mitglied einer Species ausgewählt aus der Gruppe aus *S. cerevisiae, S. bulderi, S. barnetti, S. exiguus, S. uvarum, S. diastaticus, K. lactis, K. marxianus* und *K. fragilis*.

Eine erfindungsgemäße Hefezelle ist weiter bevorzugt der Stamm Ethanol Red™ oder Lallemand1.

Eine erfindungsgemäße Fadenpilzzelle ist bevorzugt ein Mitglied eines Genus ausgewählt aus der Gruppe aus *Aspergillus, Trichoderma, Humicola, Acremonium, Fusarium,* und *Penicillium.*

Bevorzugt ist die erfindungsgemäße Zelle eine in Zellkultur gehaltene Zelle bzw. eine kultivierte Zelle.

Die erfindungsgemäßen Zellen sind mit dem Nukleinsäure-Expressionskonstrukt oder dem Nukleinsäuremolekül, wie hierin definiert, transient oder stabil transformiert.

In einer Ausführungsform exprimiert eine erfindungsgemäße Zelle weiterhin eines oder mehrere Enzyme, die der Zelle die Fähigkeit verleihen, ein oder mehrere weitere Verstoffwechselungsprodukte zu produzieren.

Ein solches weiteres Verstoffwechselungsprodukt ist dabei bevorzugt ausgewählt aus, aber nicht beschränkt auf, der Gruppe von biobasierten Chemikalien, wie Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, 1-Butanol, Isobutanol, 2-Butanol, andere Alkohole, Aminosäuren, 1,3-Propandiol, Ethylen, Glycerol, ein β-Lactam-Antibiotikum oder ein Cephalosporin, Alkanen, Terpenen, Isoprenoiden oder dem Vorläufermolekül Amorphadien des Antimalaria-Wirkstoffes Artemisinin.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zellen für die Umsetzung/Verstoffwechselung, dabei insbesondere Fermentation, von Xylose-haltigem Biomaterial und/oder die Herstellung von Bioethanol.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung der entsprechenden erfindungsgemäßen Zellen für die Umsetzung/Verstoffwechselung, dabei insbesondere Fermentation, von Xylose-haltigem Biomaterial und/oder zur Produktion eines Verstoffwechselungsprodukts.

Wobei das Verstoffwechselungsprodukt bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe von biobasierten Chemikalien (aber nicht auf diese Gruppe von biobasierten Chemikalien beschränkt ist), wie Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, 1-Butanol, Isobutanol, 2-Butanol, andere Alkohole, Aminosäuren, 1,3-Propandiol, Ethylen, Glycerol, ein β-Lactam-Antibiotikum oder ein Cephalosporin, Alkanen, Terpenen, Isoprenoiden oder dem Vorläufermolekül Amorphadien des Antimalaria-Wirkstoffes Artemisinin.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch das zur Verfügung stellen eines Verfahrens zur Produktion von Bioethanol.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst die folgenden Schritte:
(a) Umsetzung eines Mediums, welches eine Xylose-Quelle enthält, mit einer erfindungsgemäßen Zelle, die Xylose zu Ethanol umsetzt,
(b) optional, Erhalten des Bioethanols.

Das Bioethanol wird beispielsweise durch Isolieren erhalten.

Das Medium kann auch eine andere zusätzliche Kohlenstoffquelle, dabei insbesondere Glukose, enthalten.

Bevorzugt erfolgt die Produktion von Bioethanol mit einer Rate von mindestens 0,03 g Ethanol pro g Hefetrockengewicht und Stunde.

Bevorzugt ist die Ethanolausbeute mindestens 0,3 g Ethanol pro g Xylose.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch das zur Verfügung stellen eines Verfahrens zur Produktion eines Verstoffwechselungsprodukts.

Ein solches weiteres Verstoffwechselungsprodukt ist dabei bevorzugt ausgewählt aus, aber nicht beschränkt auf, der Gruppe von biobasierten Chemikalien wie Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, 1-Butanol, Isobutanol, 2-Butanol, andere Alkohole, Aminosäuren, 1,3-Propandiol, Ethylen, Glycerol, ein β-Lactam-Antibiotikum oder ein Cephalosporin, Alkanen, Terpenen, Isoprenoiden oder dem Vorläufermolekül Amorphadien des Antimalaria-Wirkstoffes Artemisinin.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

(a) Umsetzung/Verstoffwechselung, insbesondere Fermentation, eines Mediums, welches eine Xylose-Quelle enthält, mit einer entsprechenden erfindungsgemäßen Zelle, die Xylose umsetzt, um das Verstoffwechselungsprodukt zu produzieren,

(b) optional, Erhalten des Verstoffwechselungsprodukts.

Das Verstoffwechselungsprodukt wird beispielsweise durch Isolieren erhalten.

Das Medium kann auch eine andere zusätzliche Kohlenstoffquelle, dabei insbesondere Glukose, enthalten.

Den Erfindern ist es gelungen, einen redoxneutralen Stoffwechselweg in *S. cerevisiae* einzuführen, in dem die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch eine Xylose-Isomerase (XI) erfolgt (Fig. 2).

In dieser Erfindung ist es mit einem Testsystem gelungen, eine hoch funktionelle prokaryontische Xylose-Isomerase aus *Clostridium phytofermentans* in der Hefe *S. cerevisiae* zu exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die gefundene Xylose-Isomerase rekombinanten Hefen eine effiziente Xylose-Verstoffwechselung ermöglicht.

Des Weiteren waren eine Vielzahl von experimentellen Hürden und Schwierigkeiten beim Auffinden einer funktionellen Xylose-Isomerase zu überwinden:

- Für die Konstruktion des Teststammes MKY09 mussten 5 Gene überexprimiert werden.
- Die Auswahl der zu testenden Xylose-Isomerasen war nicht trivial.
- Alle bisher getesteten bakteriellen Xylose-Isomerasen zeigten in Hefe keine bis sehr geringe Aktivität.
- Hoher Aufwand bei der Kultivierung der zu testenden Organismen, die für den Screen benötigt wurden.
- Bei der erfindungsgemäßen Xylose-Isomerase handelt es sich um die erste beschriebene hoch aktive prokaryotische Xylose-Isomerase in Hefe.

- Bei der erfindungsgemäßen Xylose-Isomerase handelt es sich um die erste Xylose-Isomerase des Clusters II (von drei Clustern) von Xylose-Isomerasen (siehe Figure 3), die in Hefen funktionell exprimiert werden konnte.
- Die erfindungsgemäße Xylose-Isomerase wird nur geringfügig durch Xylitol gehemmt.

Über die Schwierigkeiten bezüglich der funktionellen Expression von Xylose-Isomerasen in Hefe gibt es einige Berichte (Gárdonyi and Hahn-Hägerdahl, 2003; sowie darin zitierte Quellen).

Den Erfindern ist es erstmals gelungen, eine prokaryotische Xylose-Isomerase in funktioneller Form in Hefen zu exprimieren, so dass diese dazu befähigt werden, Xylose unter physiologischen Bedingungen und in signifikanten Mengen zu metabolisieren und in Produkte (z.B. Ethanol) umzuwandeln. Wie im Stand der Technik beschrieben, ist dieses nicht trivial. Zahlreiche Versuche dazu wurden unternommen, und alle waren bisher nicht erfolgreich (siehe Sarthy *et al.*, 1987; Amore *et al.*, 1989; Moes *et al.*, 1996, US 6,475,768).
Den Erfindern ist es nun gelungen zu demonstrieren, dass gerade die *C. phytofermentans* Xylose-Isomerase, im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten prokaryotischen Enzymen, die Hefe dazu befähigen, Xylose unter physiologischen Bedingungen und in signifikanten Mengen zu metabolisieren und daraus Produkte herzustellen.

Beispiele für lignozellulosische Hydrolysate mit signifikantem Anteil an Xylan (Hayn *et. al.*, 1993):

Gras: 16%
Weizenkleie: 19%
Maisabfälle: 19%

Die vorliegende Erfindung wird in den folgenden Figuren, Sequenzen und Beispielen weiter verdeutlicht, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Die zitierten Referenzen sind hiermit durch Bezugnahme vollständig aufgenommen. In den Sequenzen und Figuren zeigt:

SEQ ID NO: 1 die Proteinsequenz des Xylose-Isomerase-ORFs (offener Leserahmen) von *C. phytofermentans*,
(siehe auch Genbank Accession Nos. ABX41597 und CP000885 (vom 19. November 2007)),

SEQ ID NO: 2 die Nukleinsäuresequenz des offenen Leserahmens (ORF) der Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans*,
(siehe auch Genbank Accession No. CP000885 (vom 19. November 2007)),

SEQ ID NO: 3 die Nukleinsäuresequenz des offenen Leserahmens (ORF) der Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* in einer Codon-optimierten Form.

Figur 1. *Zusammensetzung der Biomasse*
Biomasse besteht aus Zellulose, Hemizellulose und Lignin. Die am zweithäufigsten vorkommende Hemizellulose ist ein aus Pentosen, Uronsäuren und Hexosen bestehendes stark verzweigtes Polymer. Die Hemizellulose besteht zu einem großen Anteil aus den Pentosen Xylose und Arabinose.

Figur 2. *Schema für die Umsetzung von D-Xylose in rekombinanter S. cerevisiae über direkte Isomerisierung*

Figur 3. *Stammbaum der verschiedenen Xylose-Isomerasen*
Gezeigt ist der Stammbaum der getesteten Xylose-Isomerasen. Vergleiche zur Ähnlichkeit der Xylose Isomerasen wurden mit dem Programm „MEGA version 4" durchgeführt.

Figur 4. *Verwendete Vektoren*
Ausgangsplasmid für die Konstruktion von p426H7-XI-Clos (B) bzw. p426H7-opt.XI-Clos (C) war Plasmid p426HXT7-6HIS (A). Bei dem Vektor p426HXT7-6HIS handelt es sich um ein 2μ Expressionsplasmid, welches einen *URA3*-Marker besitzt. Der offene Leserahmen (ORF) bzw. deren Codon-optimierte Form der erfindungsgemäßen Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* wurde hinter den verkürzten starken *HXT7*-Promotor und dem *CYC1*-Terminator des Plasmids p426HXT7-6HIS kloniert.

Figur 5 *Wachstumsverhalten auf Xylose-haltigem Medium unter Verwendung der verschiedenen Xylose-Isomerase-Gene*

Wachstumstests von rekombinaten *S. cerevisiae* Stämmen, die den bakteriellen D-Xylose-Stoffwechsel mit der Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* enthalten. Wachstumstests wurden auf Agarplatten mit SC-Medium und mit 2 % Xylose als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt. Getestet wurde die native (B) und die Codon-optimierte Form (C) der Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans*. Als Negativ-Kontrolle diente der leere Vektor p426HXT7-6HIS (A).

Figur 6. *Xylose-Umsetzung in rekombinanten Hefestämmen unter Verwendung einer bakteriellen Xylose-Isomerase*

Die Xylose-Umsetzung von rekombinanten Hefezellen MKY09, die die native und die Codon-optimierte Form der Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentants* enthielten, wurde getestet. Als Vergleich diente der leere Vektor p426HXT7-6HIS. Wachstumskurven wurden in flüssigem SC-Medium mit 1,4% Xylose unter aeroben Bedingungen durchgeführt.
HPLC-Proben wurden parallel zur Messung der optischen Dichte bei 600nm entnommen.
Siehe auch Tabelle 2, Beispiel 3.

Figure 7. *Enzymkinetiken*

Eadie-Hofstee Plot der Xylose Umsetzung der nativen und der Codon-optimierten Xylose-Isomerase aus C. phytofermentans.

Der mit dem Plasmid p426H7-XI-Clos bzw. p426H7-opt.XI-Clos transformierte Stamm CEN.PK2-1C wurde über Nacht in synthetischem Komplettmedium mit 2 % Glukose ohne Uracil angezogen. Es wurden Rohextrakte hergestellt und quantitative Enzymtests durchgeführt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt. Die in Tabelle 3 angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aus mindestens 3 unabhängigen Messungen.

Beispiele

Methoden

1. Stämme und Medien

- Bakterien

- *E. coli* SURE (Stratagene)
- *E.coli* DH5α (Stratagene)

- *Bacillus licheniformis* (37°C)
- *Agrobacterium tumefaciens* (26°C)
- *Burkholderia xenovorans* (28°C)
- *Clostridium phytofermentans* (30°C, anaerob)
- *Lactobacillus pentosus* (30°C)
- *Leifsonia xyli* (28°C)
- *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* (28°C)
- *Robiginitalea biformata* (30°C)
- *Saccharophagus degradans* (26°C)
- *Salmonella typhimurium LT2* (28°C)
- *Staphylococcus xylosus* (37°C)
- *Streptomyces diastaticus* (28°C)
- *Xanthomonas campestris* (26°C)

andere Organismen
- *Arabidopsis thaliana (genomische DNA)*

Medien und Anzucht von *E. coli*

Vollmedium LB:

1% Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5 (siehe Maniatis, 1982).

Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 40µg/ml Ampicillin zugesetzt. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar. Die Anzucht erfolgte bei 37°C.

Medien und Anzucht von weiteren Bakterien

Zusammensetzung der Medien und Anzuchtsbedingungen siehe Angaben von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland).

-Hefe

Stamm CEN.PK2-1C

CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1MAL2-8c SUC2*)

Stamm MKY09

MKY09 basiert auf dem Stamm CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1MAL2-8c SUC2, PromTKL1::loxP-Prom-vkHXT7, PromRPE1::loxP-Prom-vkHXT7, PromRKI1::loxP-Prom-vkHXT7, PromGAL2::loxP-Prom-vkHXT7, PromXKS1::loxP-Prom-vkHXT7)*, beinhaltet weitere unbekannte Mutationen

Medien und Anzucht von Hefen

synthetisches Komplettselektivmedium SC

0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids, pH6,3, Aminosäure/Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration

synthetisches Minimalselektivmedium SM:

0,16% Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulphate, 0,5% Ammoniumsulfat ,20mM Kalium-dihydrogenphosphat, pH6,3, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration

Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im synthetischen Komplettmedium (nach Zimmermann, 1975): Adenin (0,08mM), Arginin (0,22mM), Histidin (0,25mM), Isoleucin (0,44mM), Leucin (0,44mM), Lysin (0,35mM), Methionin (0,26mM), Phenylalanin (0,29mM), Tryptophan (0,19mM), Threonin (0,48mM), Tyrosin (0,34mM), Uracil (0,44mM), Valin (0,49mM). Als Kohlenstoffquelle wurden L-Arabinose und D-Glucose eingesetzt.

2. Plasmide

Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
p426HXT7-6HIS (=p426H7)	Hamacher *et al.*, 2002	2µ-Expressionsplasmid zur Überexpression von Genen und zur Herstellung eines His_6-Epitop; *URA3*-Selektionsmarkergen, verkürzter *HXT7*-Promotor und *CYC1*-Terminator

Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
p426H7-XI-Agro	Klonierung der *XI* aus *A. tumefaciens* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Arab	Klonierung der *XI* aus *A. thaliana* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops

p426H7-XI-BaLi	Klonierung der *XI* aus *B. licheniformis* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Burk	Klonierung der *XI* aus *B. xenovorans* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Clos	Klonierung der *XI* aus *C. phytofermentans* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-opt.XI-Clos	Klonierung der Codon-optimierten *XI* aus *C. phytofermentans* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Lacto	Klonierung der *XI* aus *L. pentosus* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI- Leif	Klonierung der *XI* aus *L. xyli* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-opt.XI-Piro	Klonierung der Codon-optimierten *XI* aus Piromyces sp.E2 in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Pseudo	Klonierung der *XI* aus *P. syringae* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Robi	Klonierung der *XI* aus *R. biformata* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Saccha	Klonierung der *XI* aus *S. degradans* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Salmo	Klonierung der *XI* aus *S. typhimurium* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Staph	Klonierung der *XI* aus *S. xylosus* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Strep	Klonierung der *XI* aus *S. diastaticus* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops
p426H7-XI-Xantho	Klonierung der *XI* aus *X. campestris* in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His_6-Epitops

3. Transformation:

- Transformation von *E. coli*

Die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte durch die Elektroporationsmethode nach Dower *et al.* (1988) und Wirth (1993) mittels eines Easyject prima Geräts (EQUIBO).

- Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen mit Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz und Woods (1994).

4. Präparation von DNA

- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979), modifiziert nach Maniatis *et al.* (1982) oder alternativ mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit" der Firma Qiagen.

Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurde mit dem „Plasmid Mini Kit" der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers präpariert.

- Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Zellen einer stationären Hefekultur (5ml) wurden durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in 400µl Puffer P1 (Plasmid Mini Kit, Firma Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 400µl Puffer P2 und $^2/_3$ Volumen Glasperlen (∅ 0,45mm) erfolgte der Zellaufschluss durch 5-minütiges Schütteln auf einem Vibrax (Vibrax-VXR von Janke & Kunkel oder IKA). Der Überstand wurde mit ½ Volumen Puffer P3 versetzt, gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000rpm wurde durch Zugabe von 0,75ml Isopropanol zum Überstand die Plasmid-DNA bei Raumtemperatur gefällt. Die durch Zentrifugation für 30min bei 13000rpm pelletierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl Wasser resuspendiert. 1µl der DNA wurde für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

- Kolonie-PCR von *B. licheniformis* und *S. degradans*

Geringe Mengen an Zellen wurden mit Hilfe eines Zahnstochers von auf Platte wachsenden Bakterienkulturen entnommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von H_20, 0,2mM dNTP-Mix, 1xPCR-Puffer (enthält 1,5mM $MgCl_2$) und je 10pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer erfolgte der Zellaufschluss in einem Thermocycler der Firma Techne bei 99°C für 10 min. Dieser Ansatz wurden direkt als Template in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Durch Zugabe von 1U Polymerase wurde die Polymerasekettenreaktion mit einem Gesamtvolumen von 50µl gestartet.

- Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 240-300nm gemessen. Liegt die Reinheit der DNA, bestimmt durch den Quotient

E_{260nm}/E_{280nm}, bei 1,8, so entspricht die Extinktion E_{260nm}=1,0 einer DNA-Konzentration von 50µg dsDNA/ml (Maniatis *et al.*, 1982).

- DNA-Amplifikation mittels PCR

Verwendung des Phusion™ High Fidelity Systems

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50µl mit dem „Phusion™ High Fidelity PCR System" der Firma Finnzymes nach Angaben des Herstellers. Jeder Ansatz bestand aus 1-10ng DNA oder 1-2 Hefekolonien als Synthesevorlage, 0,2mM dNTP-Mix, 1xPuffer 2 (enthält 1,5mM $MgCl_2$), 1U Polymerase und je 100pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Techne durchgeführt und die PCR-Bedingungen nach Bedarf wie folgt gewählt:

1.	1x	30sec, 98°C	Denaturierung der DNA
2.	30x	10sec, 98°C	Denaturierung der DNA
		30sec, 52-62°C	Annealing/Bindung der Oligonukleotide an die DNA
		50sec, 72°C	DNA-Synthese/Elongation
3.	1x	7min, 72°C	DNA-Synthese/Elongation

Nach dem ersten Denaturierungsschritt wurde die Polymerase zugegeben („hot start PCR"). Die Anzahl der Syntheseschritte, die Annealingtemperatur und die Elongationszeit wurden an die spezifischen Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide bzw. an die Größe des zu erwarteten Produkts angepasst. Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft und anschließend aufgereinigt.

- DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit" der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

- Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,15-20kb erfolgte in 0,5-1%igen Agarosegelen mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer (40mM Tris, 40mM Essigsäure, 2mM EDTA) verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Als Größenstandard diente eine mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Hin*dIII geschnittene Lambda-Phagen-DNA. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit $^1/_{10}$

Volumen Blaumarker (1xTAE-Puffer, 10% Glycerin, 0,004% Bromphenolblau) versetzt und nach der Auftrennung durch Bestrahlung mit UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht.

- Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem TAE-Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366nm) ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert.

5. Enzymatische Modifikation von DNA

DNA-Restriktion

Sequenzspezifische Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen für 1 Stunde mit 2-5U Enzym pro µg DNA durchgeführt.

6. Metabolit-Analysen

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und bei 4°C für 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und aus dem Überstand 450 µl entnommen. Die Proteinfällung wurde mit 50%iger Sulfosalizylsäure durchgeführt. 1/10 Volumen Sulfosalizylsäure wurde auf die Proben gegeben, gemischt und für 20 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und nach einer weiteren Verdünnung mit Wasser konnten die Proben für die Messung eingesetzt werden. Als Standards dienten Proben mit D-Glukose, D-Xylose, Xylitol, Acetat, Glycerin und Ethanol welche in Konzentrationen von 0,05%w/v, 0,1%w/v, 0,5%w/v, 1,0%w/v und 2,0%w/v eingesetzt wurden.

Die Zuckerkonzentrationen sowie die Ethanolkonzentration wurden mittels BioLC (Dionex) gemessen. Es wurde der Autosampler „AS50", der Säulenofen „TCC-100", der RI-Detektor „RI-101" (Shodex) und die Gradienten-Pumpe „GS50" bei der Messung verwendet.

Die Messung der Proben wurde mit der Säule VA 300/7.7 Nucleogel Sugar 810 H (Macherey-Nagel) durchgeführt. Die Säule wurde bei einer Temperatur von 65°C mit 5 mM H_2SO_4 als Laufmittel und einem Fluss von 0,6 ml min^{-1} eluiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Chromeleon Version 6.50™ (Version 6.50, Dionex).

7. Messung von Enzymaktivitäten in *S. cerevisiae*

- Herstellung von Rohextrakten

50 ml Kulturen von Hefezellen wurden bis zur exponentiellen Phase in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glucose herangezogen. Die Zellen wurden geerntet, zwei Mal in Tris-HCl Puffer (pH 7,5) gewaschen und mit Hilfe von Glasperlen (Ø = 0,45 mm) für 8 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) bei 4°C aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm entfernt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit kaltem Tris-HCL Puffer (pH 7,5) auf 2 ml aufgefüllt und als Rohextrakt für die Proteinbestimmung und für die Messung der Enzymaktivitäten bzw. Xylitolinhibierung eingesetzt.

- Proteinbestimmug

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Kit „Roti-Quant" der Firma Carl Roth GmbH + Co. nach Angaben des Herstellers in Anlehnung an Bradford (1976) bestimmt. Als Standard diente dabei Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0-100 µg/ml. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 5 min bei Raumtemperatur wurden die Proben in Mikrotiterplatten mit einem Mikrotiterplatten Photometer der Firma Moelcular Divces bei OD_{590} vermessen.

- Messung der Xylose-Isomerase Aktivität

Für die Bestimmung der Xylose-Isomerase Aktivität wurden rekombinante Hefezellen, die den Vektor p426H7-XI-Clos bzw. p426H7-opt.XI-Clos enthielten herangezogen, geerntet und Rohextrakte hergestellt. Als Vergleich dienten rekombinante Hefezellen, die den leeren Vektor p426HXT7-6HIS enthielten. In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde die Umsetzung von 6,25-500 mM Xylose mit 100 µl Rohextrakt, 0,23 mM NADH, 10 mM $MgCl_2$, 2U Sorbitol-Dehydrogenase in 100 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) kontinuierlich verfolgt. Die Abnahme von NADH als Messgröße wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Xylose gestartet.

- Messung der Xylitol-Inhibierung

Für die Bestimmung der Xylitol-Inhibierung der Xylose-Isomerase wurden rekombinante Hefezellen, die den Vektor p426H7-opt.XI-Clos enthielten herangezogen, geerntet und Rohextrakte hergestellt. Als Vergleich dienten rekombinante Hefezellen mit Vektor p426H7-opt.XI-Piro bzw. Vektor p426HXT7-6HIS. In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde die Umsetzung von 6,25-500 mM Xylose mit 100 µl Rohextrakt, 10-100 mM Xylitol, 0,23 mM NADH, 10 mM $MgCl_2$, 2U Sorbitol-Dehydrogenase in 100 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5)

kontinuierlich verfolgt. Die Abnahme von NADH als Messgröße wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Xylose gestartet.

Beispiel 1: Screen einer (hoch) funktionellen prokaryontischen Xylose-Isomerase

A) Konstruktion des MKY09

In den Hefestamm CEN.PK2-1C wurden alle Gene des nicht-oxidativen Pentosephosphat-Weges, sowie die Xylulokinase (*XKS1*) und *GAL2* überexprimiert. Hierzu wurden die endogenen Promotoren gegen den verkürzten *HXT7*-Promotor ausgetauscht. Dieser Stamm wurde MKY09 genannt und für den Screen nach funktionellen Xylose-Isomerasen eingesetzt.

B) Auswahl der zu testenden Xylose-Isomerasen

Um eine Auswahl für die zu testenden Xylose-Isomerasen zu treffen, wurden Proteinsequenzen von Xylose-Isomerasen aus der Datenbank NCBI BLAST verglichen. Ein Auszug der erhaltenen Xylose-Isomerasen ist in Fig. 3 gezeigt. Es wurden 14 Xylose-Isomerasen aus unterschiedlichen Organismen ausgewählt, um deren Funktionalität in Hefe zu testen.

C) Durchführung des Screens

Hierzu wurde genomische DNA aus den Organismen isoliert. Die Zellen wurden herangezogen, geerntet und aufgeschlossen (siehe dazu „Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*“ bzw. „Kolonie-PCR aus *B. licheniformis* und *S. degradans*). Der offene Leserahmen (ORF) von *XI* aus den genannten Organismen wurde mit Primern amplifiziert, die zusätzlich homologe Bereiche zum *HXT7*-Promotor bzw. *CYC1*-Terminator aufwiesen. Zusammen mit dem *EcoRI*/*BamHI* linearisierten Vektor p426HXT7-6HIS wurden die erhaltenen PCR-Produkte in Hefe transformiert und über *in vivo*-Rekombination in das Plasmid zwischen den *HXT7*-Promotor bzw. *CYC1*-Terminator kloniert (Fig. 4). Die Sequenz der erhaltenen Plasmide wurde über Restriktionsanalyse verifiziert. Weiterhin sollte von den neuen Isomerasen die Funktionalität und deren Effekt auf den Xylose-Umsatz in Hefe untersucht werden. Aus den Organismen *Streptomyces diastaticus* und *Leifsonia xyli* gelang es jedoch nicht, das gewünschte PCR-Produkt mit der Xylose-Isomerase zu amplifizieren. Beide Xylose-Isomerasen konnten folglich nicht auf Funktionalität in Hefe überprüft werden.

D) Wachstumsverhalten (Platte)

Von den 12 verschiedenen, getesteten Xylose-Isomerasen wurde eine Xylose-Isomerase gefunden, die in Hefestamm MKY09 funktionell war. Rekombinante Hefen, die die Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* enthielten, zeigten gutes Wachstum auf Xylose-haltigen Platten (Fig.5).

Beispiel 2: Codon-Optimierung des Genes für den Xylose-Abbau in Hefe

A) Codon-Optimierung von Genen nach dem Codongebrauch der Glycolysegene aus *S. cerevisiae*

Der bevorzugte Codongebrauch der Glycolysegene aus *S. cerevisiae* wurde ermittelt und ist in Tabelle 1 aufgelistet. Es wurde der ORF des Genes *XI aus C. phytofermentans* Codon-optimiert. Das heisst, die Sequenzen der offenen Leserahmen wurden dem unten angeführten bevorzugten Codon-Gebrauch angepasst. Die Proteinsequenz der Enzyme blieb unverändert. Die Gene wurden bei einer externen Firma synthetisiert und in getrockneter Form in firmeneigenen Hausvektoren geliefert.

Nähere Angaben zu der Synthese von Genen finden sich unter www.geneart.com.

Tabelle 1: Bevorzugter Codon-Gebrauch der glykolytischen Gene aus *S. cerevisiae*.

Aminosäure	Codon-Gebrauch von Codon-optimierten Genen
Ala	GCT
Arg	AGA
Asn	AAC
Asp	GAC
Cys	TGT
Gln	CAA
Glu	GAA
Gly	GGT
His	CAC
Ile	ATT
Leu	TTG
Lys	AAG
Met	ATG
Phe	TTC
Pro	CCA
Ser	TCT
Thr	ACC
Trp	TGG
Tyr	TAC
Val	GTT
Stopp	TAA

B) Einführung des Codon-optimierten Xylose-Isomerase Genes in den Stamm MKY09

Um das Codon-optimierte Xylose-Isomerase Gen in Stamm MKY09 zu testen, musste das Gen in einen Hefevektor subkloniert werden. Hierfür wurde der Codon-optimierte *XI*-ORF mit Primern amplifiziert und in den linearisierten Vektor p426HXT7-6HIS kloniert (siehe „Durchführung des Screens"). Die Sequenz des erhaltenen Plasmids p426H7-opt.XI-Clos wurde über Restriktionsanalyse verifiziert. Zum Test der Funktionalität der Codon-optimierten Isomerase wurde das Plasmid p426H7-opt.XI-Clos in den Stamm MKY09 transformiert. Rekombinante Hefestämme zeigten auf Platten mit Xylose-haltigem Medium gutes Wachstum (Fig.5) Es folgten weitere Charakterisierungen der nativen und der Codon-optimierten *XI* aus *C. phytofermentans*.

Beispiel 3: Charakterisierung der funktionellen prokaryontischen Xylose-Isomerase

A) Wachstumsverhalten und Xyloseumsetzung

Das Wachstum des Stammes MKY09 mit der nativen und der Codon-optimierten Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* wurde in Wachstumstests auf Xylose-haltigem Medium unter aeroben Bedingungen untersucht. Als Vergleich diente der leere Vektor p426HXT7-6HIS.

Die Stämme wurden in SC-Medium mit 0,1% Glukose und 1,4% Xylose herangezogen und mit einer OD_{600nm} = 0,2 in 50ml SC-Medium mit 0,1% Glukose und 1,4 % Xylose angeimpft. Die Inkubation erfolgte in Schüttelkolben unter aeroben Bedingungen bei 30°C. Es wurden mehrfach Proben zur Bestimmung der optischen Dichte sowie zur Bestimmung der Metabolitzusammensetzung entnommen.

Die Wachstumskurven zeigten, dass die rekombinanten Hefen alle auf Glukose bis zu einer OD600 von 2,5 anwuchsen (Tabelle 2). Nach weiteren 50 h fing der Hefestamm, der die native Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* enthielt, weiter auf Xylose an zu wachsen und erreichte eine End-OD600 von 3,5 mit einer maximalen Wachstumsrate von 0,0058 h^{-1} auf Xylose-haltigem Medium. Der Hefestamm mit der Codon-optimierten Xylose-Isomerase erreichte ebenfalls eine End-OD600 von 3,5. Die maximale Wachstumsrate betrug 0,0072 h^{-1}. Hefetransformanden mit dem Leer-Vektor p426HXT7-6HIS wiesen kein Wachstum auf Xylose auf und begannen bereits nach 150 h abzusterben.

Die rekombinanten Hefen, die die native Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* bzw. die Codon-optimierte Xylose Isomerase enthielten, setzten in 312 Stunden über 2,6 g Xylose um (Fig. 6).

Tabelle 2. Bestimmung der maximalen Wachstumsrate auf Xylose (μ)

MKY09 transformiert mit Plasmid	max. Wachstumsrate
p426H7-XI-Clos	0,0058
p426H7-opt.XI-Clos	0,0072

Mit dem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Einführung der nativen sowie der Codon-optimierten Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* den rekombinanten *S. cerervisiae* Stämmen das Wachstum auf D-Xylose sowie deren Umsetzung ermöglicht. Durch die Codon-Optimierung der Xylose-Isomerase konnte eine höhere max. Wachstumsrate erreicht werden.

B) Messung der Xylose-Isomerase Aktivität

Enzymtests wurden direkt nach der Rohextraktherstellung durchgeführt. XI-Aktivität wurde bei 30°C in einem Reaktionsmix (100mM TrisHCl, pH 7,5; 10mM $MgCl_2$, NADH 0,23 mM; Sorbitiol-Dehydrogenase 2U) mit unterschiedlichen Konzentrationen Rohextrakt durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 6,25-500 mM Xylose gestartet.

Die Bestimmung der Enzymkinetik der nativen Form der Xylose-Isomerase ergab einen K_m-Wert von 61,85 ± 3,41mM und für die Codon-optimierte Form einen K_m-Wert von 66,01 ± 1mM (Fig. 7 und Tabelle 3). Wie erwartet, sind somit die K_m-Werte gleich, da sie sich nicht signifikant von einander unterscheiden.

V_{max}(μmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$) betrug 0,0076 für die native Form der Xylose-Isomerase und 0,0344 für die Codon-optimierte Form (Fig. 7). Folglich konnte durch die Codon-Optimierung des Enzyms V_{max} um über 450% gesteigert werden.

Tabelle 3

CEN.PK2-1C transformiert mit Plasmid	Vmax (μmol min^{-1} mg Protein^{-1})	Km (mM)
p426H7-XI-Clos	0,0076	61,85 ± 3,4
p426H7-opt.XI-Clos	0,0344	66,01 ± 1

Der mit dem Plasmid p426H7-XI-Clos bzw. p426H7-opt.XI-Clos transformierte Stamm CEN.PK2-1C wurde über Nacht in synthetischem Komplettmedium mit 2 % Glukose ohne Uracil angezogen. Es wurden Rohextrakte hergestellt und quantitative Enzymtests durchgeführt.

C) Messung der Xylitol-Inhibierung

Die Bestimmung der Xylitol-Inhibierung der Xylose-Isomerasen erfolgte direkt nach der Rohextraktherstellung. XI-Aktivität wurde bei 30°C in einem Reaktionsmix (100mM TrisHCl, pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$; NADH 0,23 mM; Sorbitiol-Dehydrogenase 2U) mit unterschiedlichen Konzentrationen Rohextrakt durchgeführt. Zusätzlich befanden sich im Reaktionsmix unterschiedliche Konzentrationen an Xylitol (10-100mM). Die Reaktion wurde mit 6,25-500 mM Xylose gestartet.

K_i wurde durch die Gleichung $K_m' = K_m * (1+ i/K_i)$ ermittelt, wobei i die eingesetzte Xylitol Konzentration und K_m' der apparente K_m Wert bei entsprechender Xylitol Konzentration darstellen.

Die Bestimmung der Kinetiken der Xylitol-Inhibierung der Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* ergab einen K_i-Wert von 14,24 ± 1,48mM (Tabelle 4). Wie bereits mehrfach beschrieben (Yamanaka *et al.,* 1969 und darin zitierte Quellen) handelt es sich um eine kompetitive Inhibition.

Tabelle 4

CEN.PK2-1C transformiert mit Plasmid	Ki (mM)
p426H7-opt. XI-Piro	4,67 ± 1,77
p426H7-opt. XI-Clos	14,51 ± 1,08

Der mit dem Plasmid p426H7-opt.XI-Clos bzw. p426H7-opt.XI-Piro transformierte Stamm CEN.PK2-1C wurde über Nacht in synthetischem Komplettmedium mit 2 % Glukose ohne Uracil angezogen. Es wurden Rohextrakte hergestellt und quantitative Enzymtests mit konstanten Xylitol-Konzentrationen von 10-100mM durchgeführt.

Als Vergleich diente die Xylose-Isomerase aus *Piromyces* sp.E2 und der leere Vektor p426HXT7-6HIS. Der ermittelte K_i-Wert der Xylose-Isomerase aus *Piromyces* sp.E2 betrug 4,67 ± 1,77 mM.

Aus den ermittelten K_i-Werten geht hervor, dass die Xylose-Isomerase aus *C. phytofermentans* durch Xylitol signifikant geringer inhibiert wird als die Xylose-Isomerase aus *Piromyces* sp.E2.

D) Beispiele für Vektoren für die Xylose-Isomerase

Ausgangsplasmid für die Konstruktion von p426H7-opt.XI-Clos war das Plasmid p426HXT7-6HIS. Bei dem Vektor handelt es sich um ein 2μ Expressionsplasmid, welches einen *URA3*-Marker besitzt.

Weitere mögliche Expressionsvektoren sind aus der Serie pRS303X, p3RS305X und p3RS306X. Hierbei handelt es sich um integrative Vektoren, die einen dominanten Antibiotika-Marker besitzen. Nähere Angaben zu diesen Vektoren finden sich bei Taxis und Knop (2006).

Referenzen

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

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

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

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

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

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

Birnboim, H.C. und J. Doly (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523

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

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

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

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

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

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

Gárdonyi, M. and Hahn-Hägerdahl, B. (2003)

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

Enzym. Microb. Technol. 32, 252-259

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

High efficiency transformation in yeast.

In: Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, J.A. Johnston (Ed.).

Oxford University Press pp. 121-134

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

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization.

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

Harhangi, H.R. (2003)

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

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

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

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

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

Ho, N.W.Y., Chen, Z. und Brainard, A.P. (1998)

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

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

Kötter, P. und Ciriacy, M. (1993)

Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae.*

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

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

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

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

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

Molecular cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

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

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

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

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

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

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

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

A novel xylose isomerase from *Neurospora crassa.*
Biotechnol. Lett. **18:**1267-1270

Sarthy AV, McConaughy BL, Lobo Z, Sundstrom JA, Furlong CE, Hall BD,
Expression of the Escherichia coli xylose isomerase gene in Saccharomyces cerevisiae. *Appl Environ Microbiol.* 1987 Sep;53(9):1996-2000

Schaaff-Gerstenschläger, I. und Miosga, T. (1997)
The pentose phosphate pathway. In: Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications. Zimmermann, F.K. und Entian K.-D (Ed.), Kapitel 15. Technomic, Lancaster, PA

Taxis, C. und Knop, M. (2006)
System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae.*
BioTechniques **40**, No. 1

Tomoyeda, M. und Horitsu, H. (1964)
Pentose metabolism in *Candida utilis* Part I: Xylose isomerase.
Agric. Biol. Chem. 28:139-143.

Vongsuvanglert, V. und Tani, Y. (1988)
Purification and characterisation of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in sorbitol production from glucose.
Agric. Biol. Chem. **52:**1818-1824.

Yamanaka, K. (1969)
Inhibition of D-xylose isomerase by pentitols and D-lyxose.
Arch. Biochem. Biophys. 131, 502-506.

Zimmermann, F. K. (1975)
Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.*
Mutation Res. **31:**71-81.

Ansprüche

1. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, für die Transformation einer Zelle, bevorzugt für die rekombinante Expression und Herstellung der Xylose-Isomerase, und/oder für die Umsetzung von Xylose zu Xylulose durch die Zelle,
wobei die Xylose-Isomerase (XI) aus *Clostridium phytofermentans* stammt und bevorzugt eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens 70%, bevorzugt mindestens 80% identisch zu der Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO. 1 ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1 für
- die Umsetzung und/oder Verstoffwechselung von Xylose-haltigem Biomaterial,
- die Herstellung von biobasierten Chemikalien,
- die Herstellung von Biobutanol und/oder von Bioethanol.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu mindestens 70% identisch, bevorzugt 80% identisch zu der Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO. 2 ist.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für die Verwendung in einer Wirtszelle Codon-optimiert ist.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert, eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu mindestens 70% identisch, bevorzugt 80% identisch zu der Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO. 3 ist.

6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäure-Expressionskonstrukt ist, das Promotor- und

Terminatorsequenzen umfasst, wobei der Promotor operativ verbunden ist mit der Nukleinsäuresequenz, die für eine Xylose-Isomerase (XI) kodiert.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das Nukleinsäure-Expressionskonstrukt weiterhin 5' und/oder 3' Erkennungssequenzen und/oder Selektionsmarker umfasst.

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Hefezelle oder eine Fadenpilzzelle ist.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die Hefezelle ein Mitglied eines Genus ausgewählt aus der Gruppe aus *Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Pichia, Schizosaccharomyces, Hansenula, Kloeckera, Schwanniomyces, Arxula* und *Yarrowia* ist,
und bevorzugt ein Mitglied einer Species ausgewählt aus der Gruppe aus *S. cerevisiae, S. bulderi, S. barnetti, S. exiguus, S. uvarum, S. diastaticus, K. lactis, K. marxianus* und *K. fragilis* ist.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Fadenpilzzelle ein Mitglied eines Genus ausgewählt aus der Gruppe aus *Aspergillus, Trichoderma, Humicola, Acremonium, Fusarium,* und *Penicillium* ist.

11. Zelle, die mit einem Nukleinsäure-Expressionskonstrukt transformiert ist, welches umfasst:
(a) eine Nukleinsäuresequenz, die für eine prokaryotische Xylose-Isomerase (XI) kodiert,
wobei die Xylose-Isomerase (XI) aus *Clostridium phytofermentans* stammt und bevorzugt eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens 70%, bevorzugt mindestens 80% identisch zu der Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO. 1 ist,
(b) einen operativ mit der Nukleinsäuresequenz verbundenen Promoter, der die Expression der Xylose-Isomerase (XI) in der Zelle ermöglicht,
wobei die Expression des Nukleinsäure-Expressionskonstrukts der Zelle die Fähigkeit verleiht, Xylose direkt zu Xylulose zu isomerisieren,
wobei die Zelle insbesondere eine eukaryotische Zelle ist.

12. Zelle nach Anspruch 11, wobei die Zelle mit einem Nukleinsäuremolekül, wie in den Ansprüchen 1 bis 10 definiert, transformiert ist.

13. Zelle nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Zelle eine Hefezelle oder eine Fadenpilzzelle ist.

14. Zelle nach Anspruch 13, wobei die Hefezelle ein Mitglied eines Genus ausgewählt aus der Gruppe aus *Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Pichia, Schizosaccharomyces, Hansenula, Kloeckera, Schwanniomyces, Arxula* und *Yarrowia* ist,
und bevorzugt ein Mitglied einer Species ausgewählt aus der Gruppe aus *S. cerevisiae, S. bulderi, S. barnetti, S. exiguus, S. uvarum, S. diastaticus, K. lactis, K. marxianus* und *K. fragilis* ist.

15. Zelle nach Anspruch 13, wobei die Fadenpilzzelle ein Mitglied eines Genus ausgewählt aus der Gruppe aus *Aspergillus, Trichoderma, Humicola, Acremonium, Fusarium,* und *Penicillium* ist.

16. Zelle nach einem der Ansprüche 11 bis 15, welche mit dem Nukleinsäure-Expressionskonstrukt oder dem Nukleinsäuremolekül, wie in den Ansprüchen 1 bis 10 definiert, transient oder stabil transformiert ist.

17. Zelle nach einem der Ansprüche 11 bis 16, welche weiterhin eines oder mehrere Enzyme exprimiert, die der Zelle die Fähigkeit verleihen, weitere Verstoffwechselungsprodukte zu produzieren,
wobei die weiteren Verstoffwechselungsprodukte bevorzugt ausgewählt sind aus der Gruppe der biobasierten Chemikalien, wie Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, 1-Butanol, Isobutanol, 2-Butanol, andere Alkohole, Aminosäuren, 1,3-Propandiol, Ethylen, Glycerol, ein β-Lactam-Antibiotikum oder ein Cephalosporin, Alkanen, Terpenen, Isoprenoiden oder dem Vorläufermolekül Amorphadien des Antimalaria-Wirkstoffes Artemisinin.

18. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 11 bis 16 für die Umsetzung und Verstoffwechselung, insbesondere Fermentation, von Xylose-haltigem Biomaterial und/oder die Herstellung von Bioethanol.

19. Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 11 bis 17 für die Umsetzung und Verstoffwechselung, insbesondere Fermentation, von Xylose-haltigem Biomaterial und/oder zur Produktion eines Verstoffwechselungsprodukts,
wobei das Verstoffwechselungsprodukt bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe der biobasierten Chemikalien, wie Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, 1-Butanol, Isobutanol, 2-Butanol, andere Alkohole, Aminosäuren, 1,3-Propandiol, Ethylen, Glycerol, ein β-Lactam-Antibiotikum oder ein Cephalosporin, Alkanen, Terpenen, Isoprenoiden oder dem Vorläufermolekül Amorphadien des Antimalaria-Wirkstoffes Artemisinin.

20. Verfahren zur Produktion von Bioethanol, umfassend die Schritte:
(a) Umsetzung eines Mediums, welches eine Xylose-Quelle enthält, mit einer Zelle nach einem der Ansprüche 11 bis 16, die Xylose zu Ethanol umsetzt,
(b) optional, Erhalten des Ethanols.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Medium eine weitere Kohlenstoffquelle, insbesondere Glukose, enthält.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei die Produktion von Bioethanol mit einer Rate von mindestens 0,03 g Ethanol pro g Hefetrockengewicht und Stunde erfolgt.

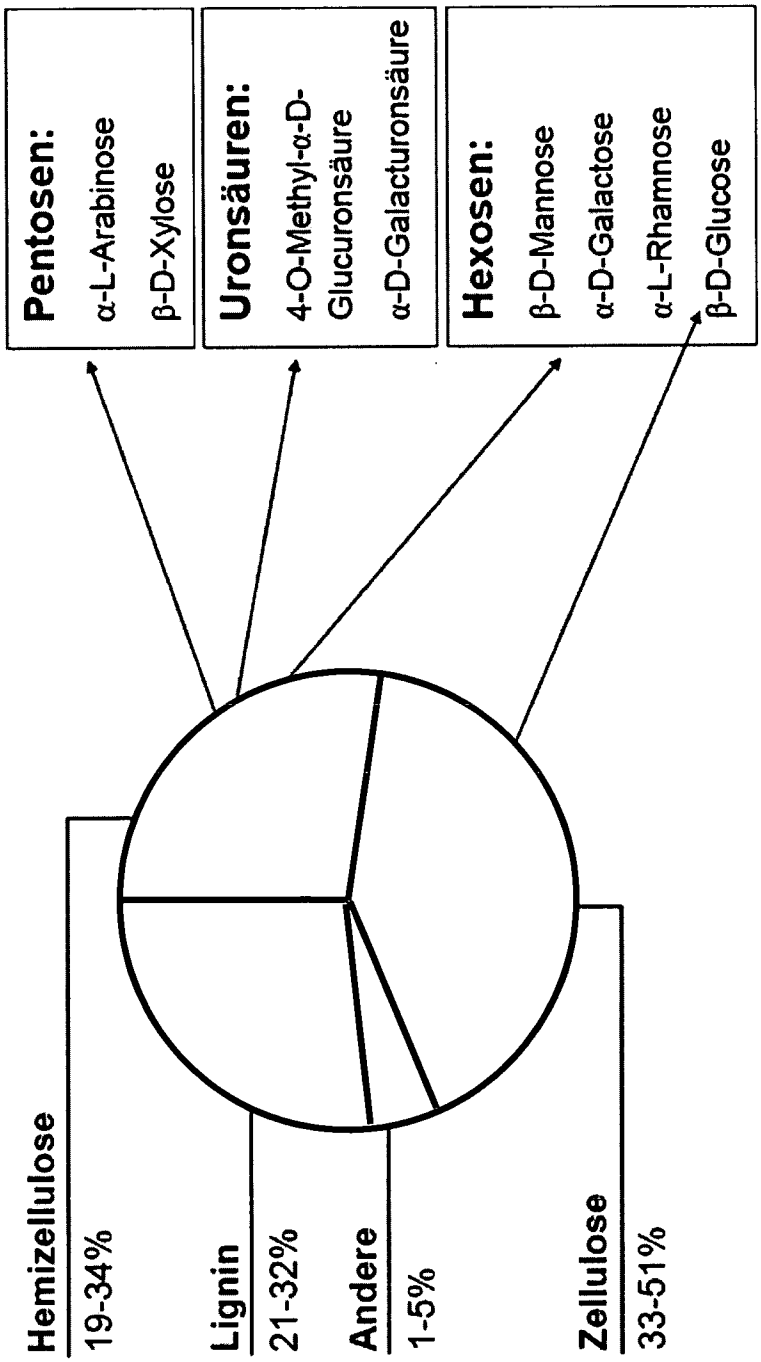
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei die Ethanolausbeute mindestens 0,3 g Ethanol pro g Xylose ist.

24. Verfahren zur Produktion eines Verstoffwechselungsprodukts umfassend die Schritte:
(a) Umsetzung, eines Mediums, welches eine Xylose-Quelle enthält, mit einer Zelle nach Anspruch 17, die Xylose umsetzt, um das Verstoffwechselungsprodukt zu produzieren,
(b) optional, Erhalten des Verstoffwechselungsprodukts,

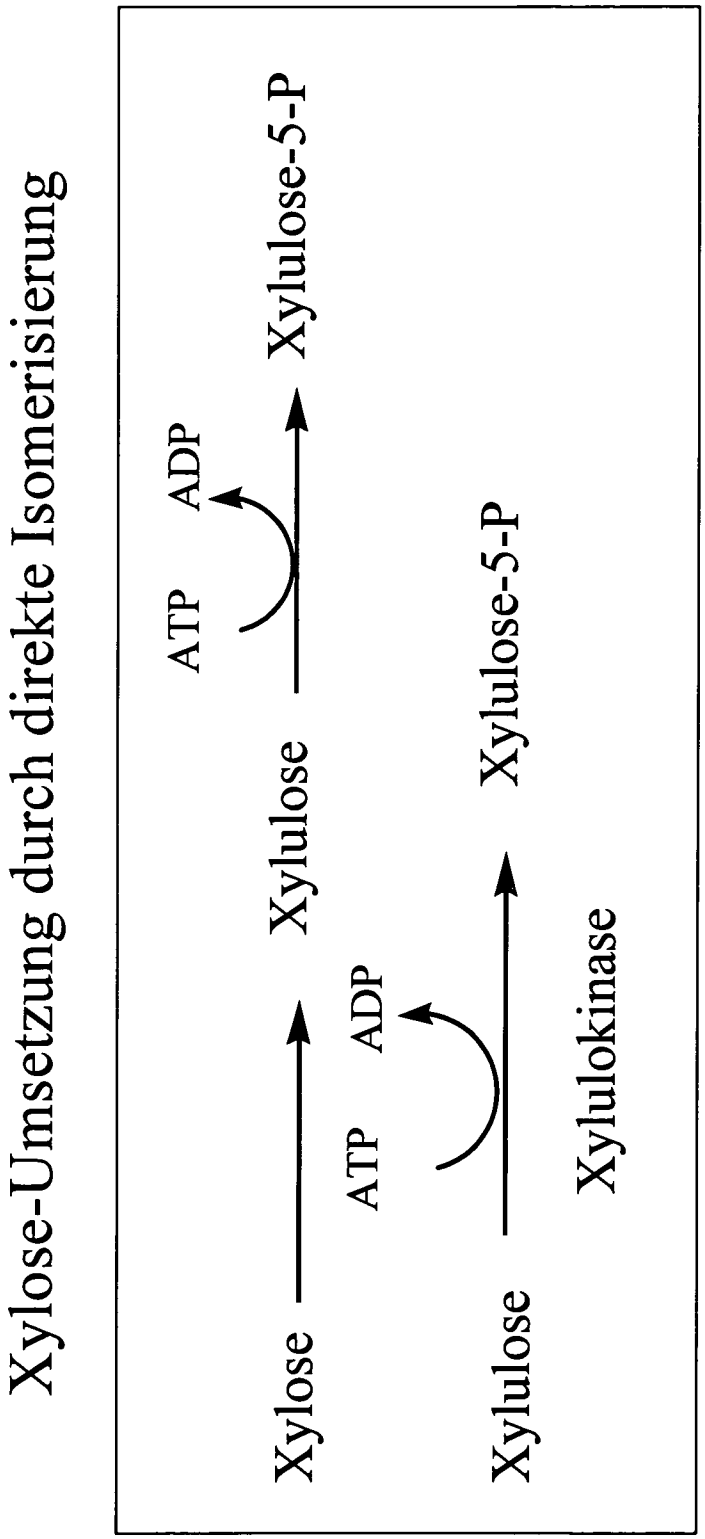
wobei das Verstoffwechselungsprodukt bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe der biobasierten Chemikalien, wie Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, 1-Butanol, Isobutanol, 2-Butanol, andere Alkohole, Aminosäuren, 1,3-Propandiol, Ethylen, Glycerol, ein β-Lactam-Antibiotikum oder ein Cephalosporin, Alkanen, Terpenen, Isoprenoiden oder dem Vorläufermolekül Amorphadien des Antimalaria-Wirkstoffes Artemisinin.

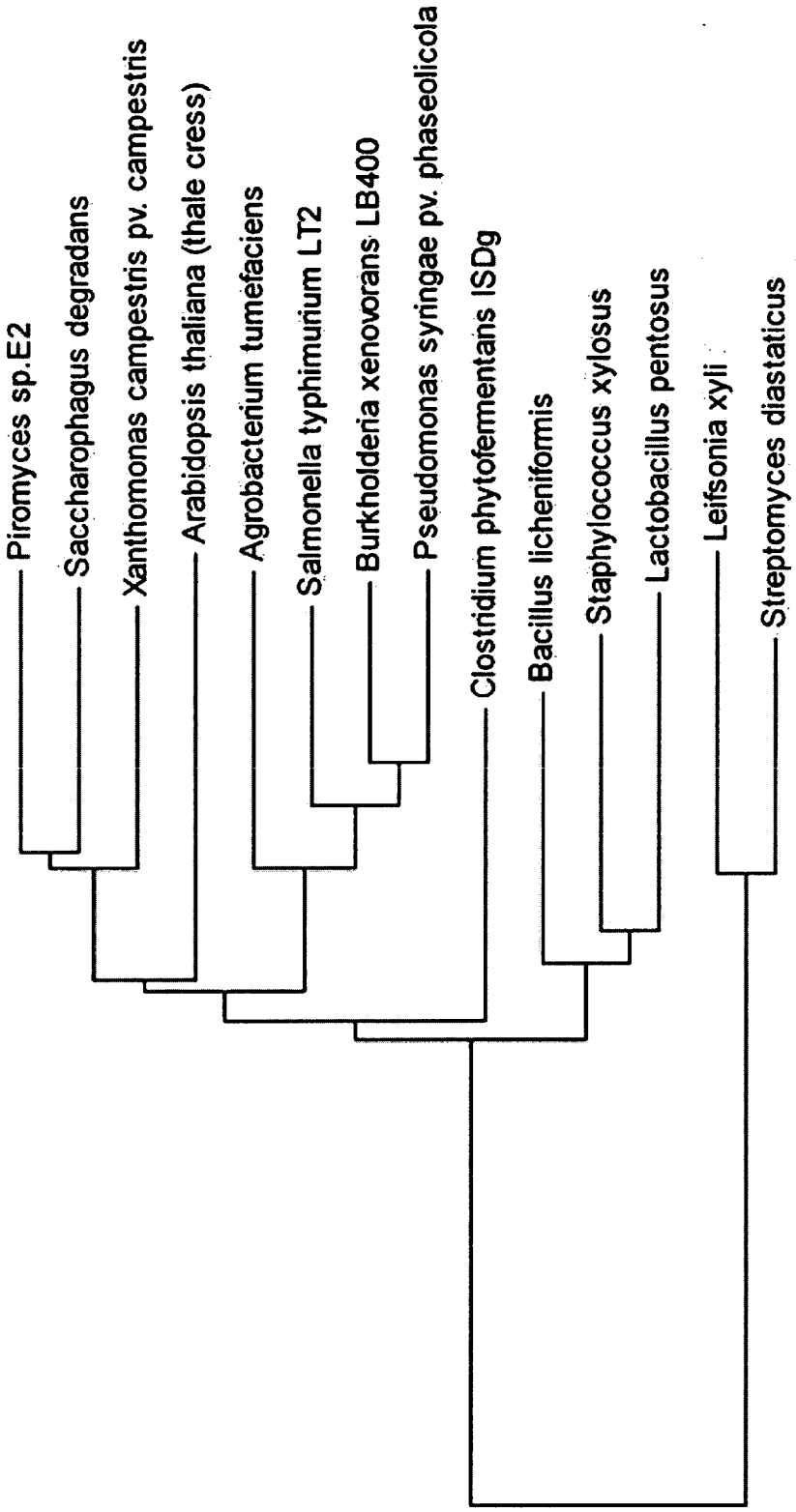
25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das Medium eine weitere Kohlenstoffquelle, insbesondere Glukose, enthält.

Figur 1

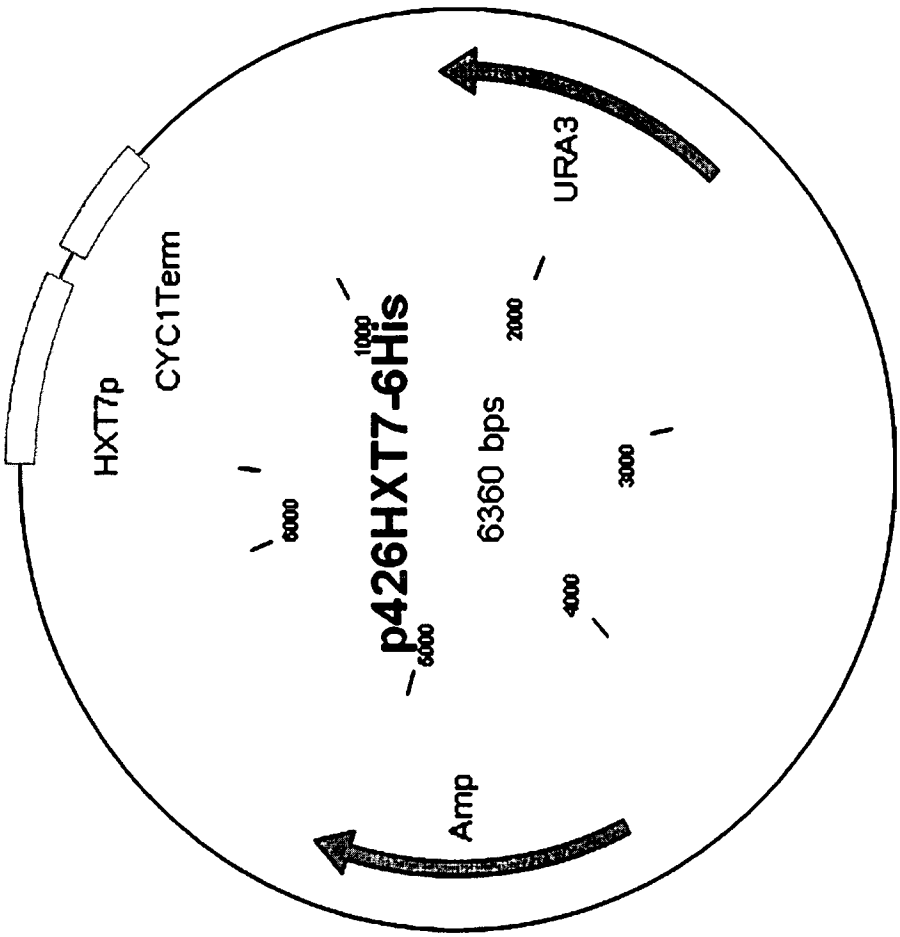

Pentosen:
α-L-Arabinose
β-D-Xylose
Uronsäuren:
4-O-Methyl-α-D-Glucuronsäure
α-D-Galacturonsäure
Hexosen:
β-D-Mannose
α-D-Galactose
α-L-Rhamnose
β-D-Glucose
Hemizellulose
19-34%
Lignin
21-32%
Andere
1-5%
Zellulose
33-51%

Figur 2

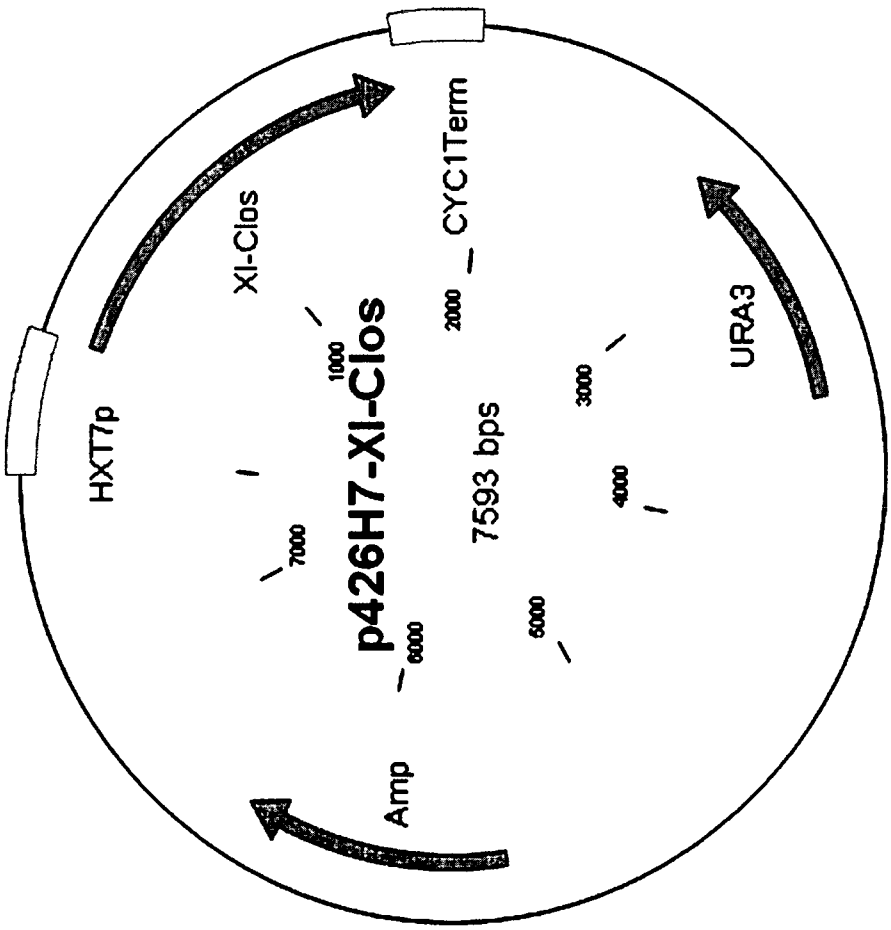

Xylose-Umsetzung durch direkte Isomerisierung
Xylose
ATP
ADP
Xylulose
Xylulose-5-P
Xylulose
ATP
ADP
Xylulose-5-P
Xylulokinase


Piromyces sp.E2
Saccharophagus degradans
Xanthomonas campestris pv. campestris
Arabidopsis thaliana (thale cress)
Agrobacterium tumefaciens
Salmonella typhimurium LT2
Burkholderia xenovorans LB400
Pseudomonas syringae pv. phaseolicola
Clostridium phytofermentans ISDg
Bacillus licheniformis
Staphylococcus xylosus
Lactobacillus pentosus
Leifsonia xyli
Streptomyces diastaticus

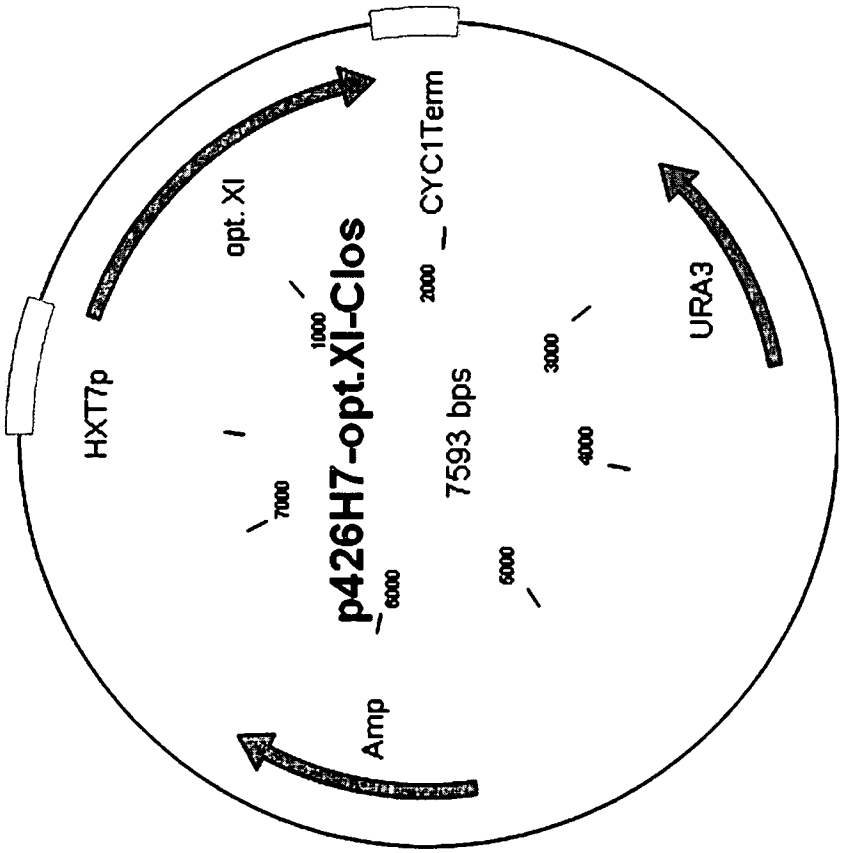
Figur 3


p426HXT7-6His
6360 bps
HXT7p
CYC1Term
URA3
Amp
1000
2000
3000
4000
5000
6000

Figur 4 A

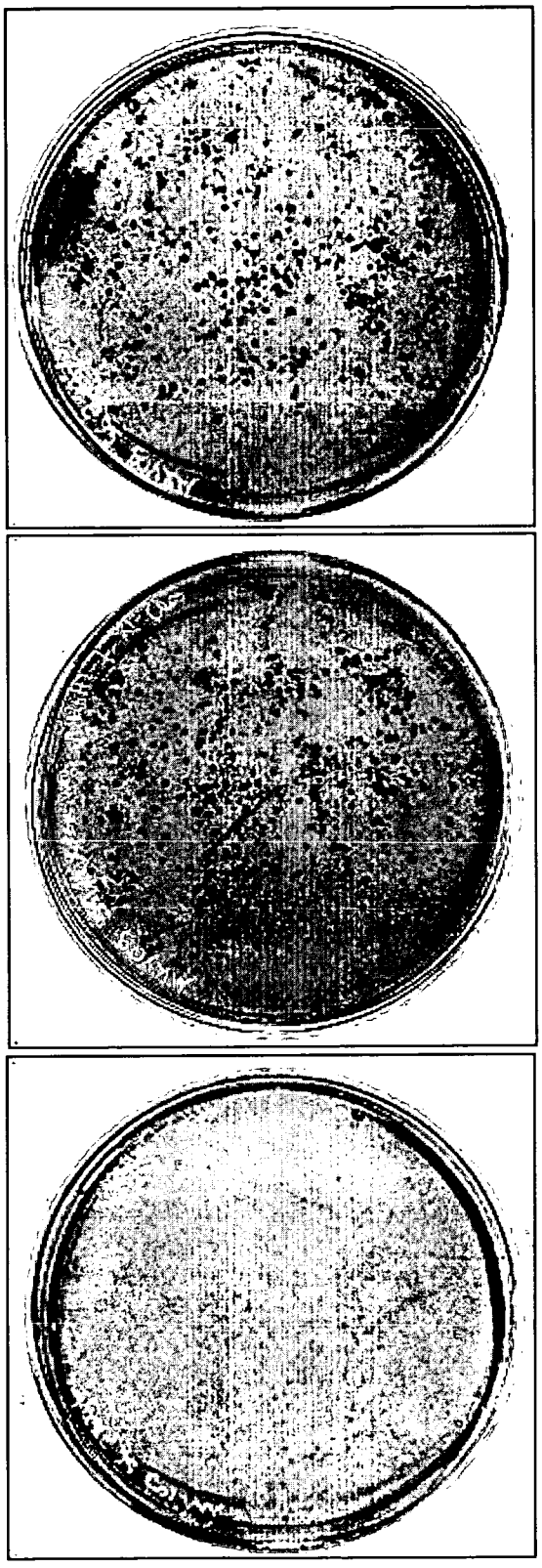

p426H7-Xl-Clos
7593 bps
HXT7p
Xl-Clos
CYC1Term
URA3
Amp
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

Figur 4 B

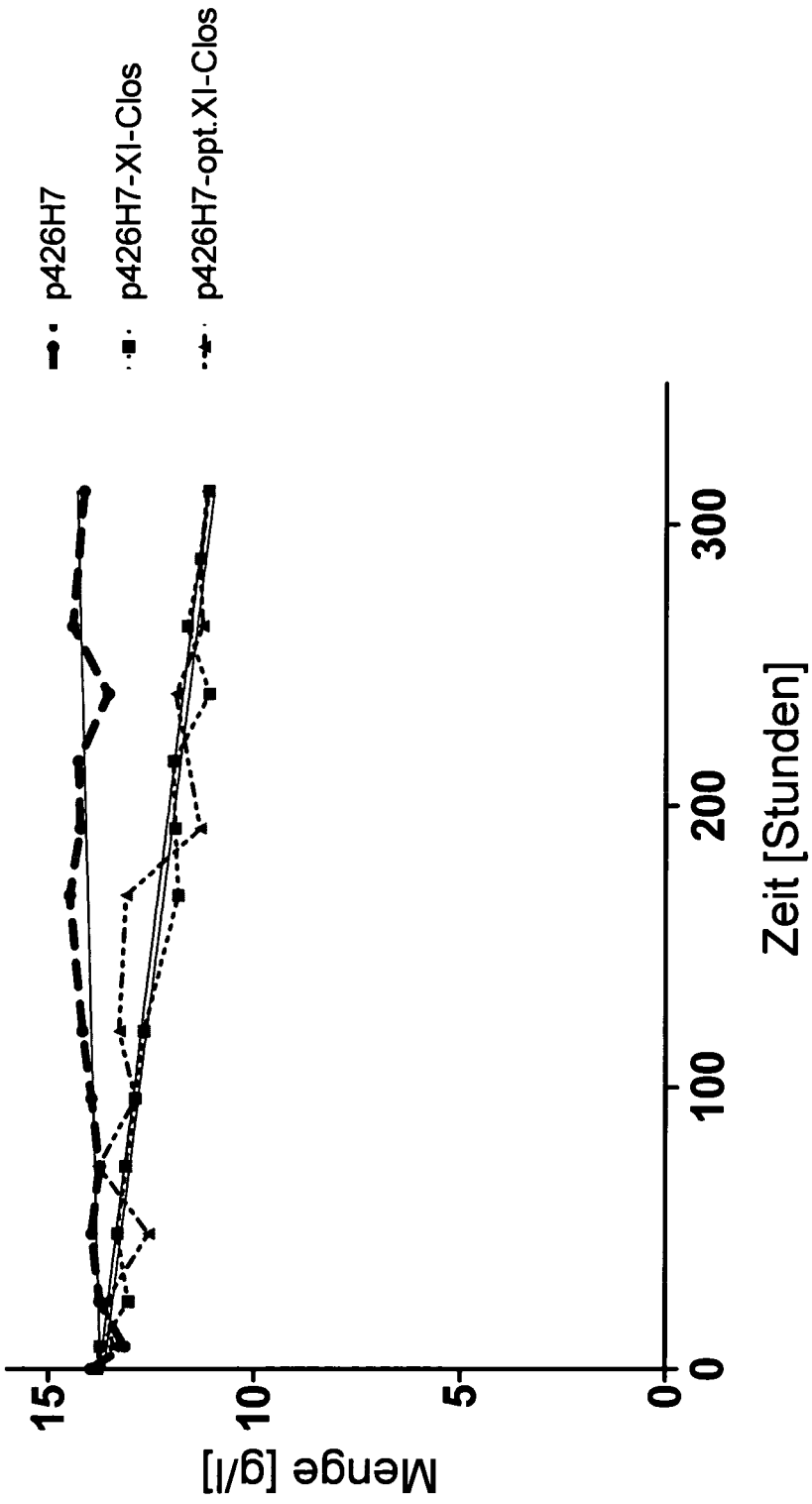

HXT7p
opt. XI
CYC1Term
URA3
Amp
p426H7-opt.XI-Clos
7593 bps
1000
2000
3000
4000
6000
7000

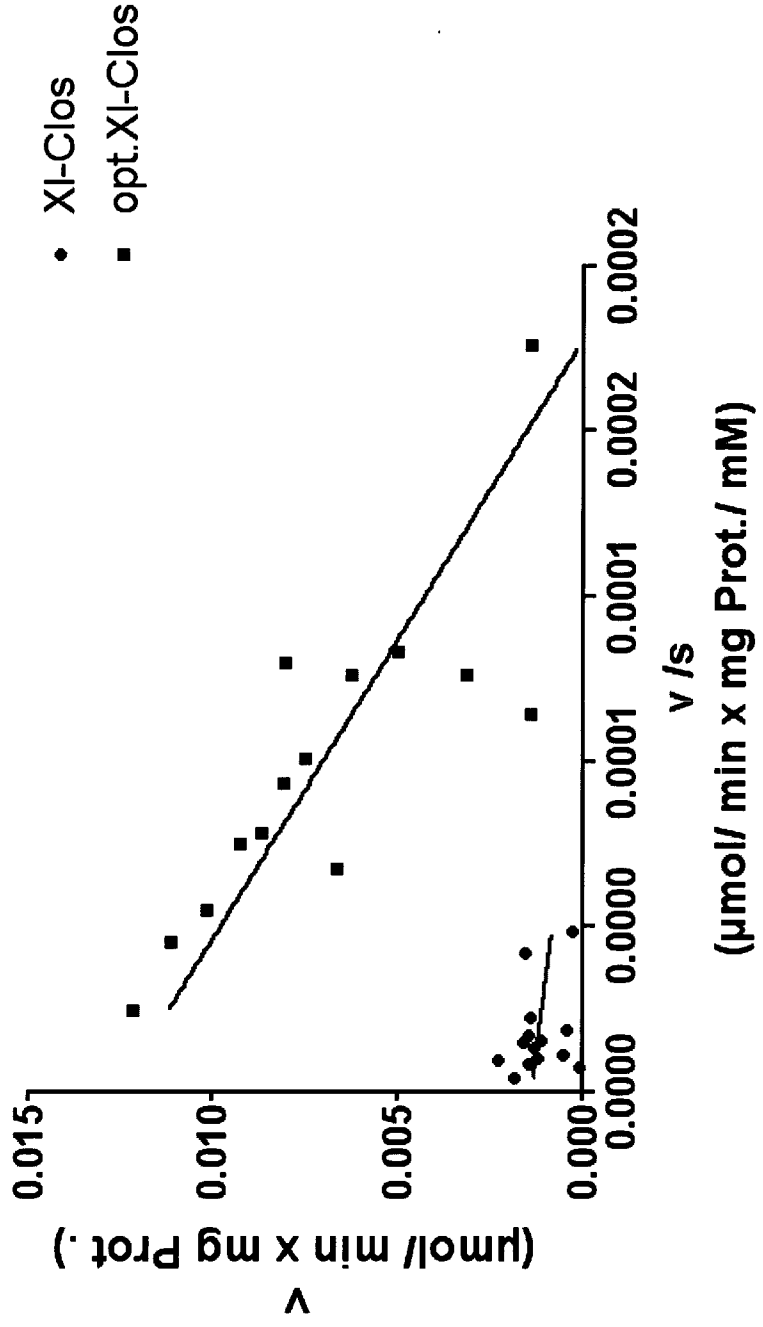
Figur 4 C

Figur 5



Figur 6


p426H7
p426H7-Xl-Clos
p426H7-opt.Xl-Clos
Menge [g/l]
15
10
5
0
0
100
200
300
Zeit [Stunden]


Xl-Clos
opt.Xl-Clos
v
(µmol/ min x mg Prot.)
0.015
0.010
0.005
0.000
0.0000
0.0000
0.0001
0.0001
0.0002
0.0002
v /s
(µmol/ min x mg Prot./ mM)

Figur 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/10 C12N15/81 C12P7/10 C12R1/645 C12N9/92
C12P19/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C12P C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, COMPENDEX, EMBASE, MEDLINE, FSTA, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/062430 A (ROYAL NEDALCO B V [NL]; OP DEN CAMP HUBERTUS JOHANNES [NL]; HARHANGI H) 31 July 2003 (2003-07-31) das ganze Dokument, insbesondere die Ansprüche	1,2, 6-21,24, 25
X	ANTONIUS J A VAN MARIS ET AL: "Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status" ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 90, no. 4, 11 October 2006 (2006-10-11), pages 391-418, XP019446684 ISSN: 1572-9699 das ganze Dokument, insbesondere S.398-404 (Xylose fermentation).	1,2, 6-21,24, 25

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 August 2009	04/09/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bassias, Ioannis

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUYPER M ET AL: "High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: The key to efficient ethanolic fermentation of xylose by Saccharomyces cerevisiae?" FEMS YEAST RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE, TOKYO, NL, vol. 4, no. 1, 1 October 2003 (2003-10-01), pages 69-78, XP002312913 ISSN: 1567-1356 das ganze Dokument, insbesondere Tabelle 1	1,2, 6-21,24, 25
X	KUYPER M ET AL: "Minimal metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle" FEMS YEAST RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE, TOKYO, NL, vol. 4, no. 6, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 655-664, XP002312911 ISSN: 1567-1356 das ganze Dokument, insbesondere Abb. 4 und 5	1,2, 6-21,24, 25
X	WALFRIDSSON M ET AL: "Ethanolic fermentation of xylose with Saccharomyces cerevisiae harboring the Thermus thermophilus xylA gene, which expresses and active xylose (glucose) isomerase" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 62, no. 12, 1 December 1996 (1996-12-01), pages 4648-4651, XP002117639 ISSN: 0099-2240 the whole document	1,2, 6-21,24, 25
X	US 6 475 768 B1 (OTERO RICARDO ROMAN CORDERO [ZA] ET AL) 5 November 2002 (2002-11-05) the whole document	1,2, 6-21,24, 25
A	WIEDEMANN BEATE ET AL: "Codon-optimized bacterial genes improve L-Arabinose fermentation in recombinant Saccharomyces cerevisiae" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 7, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 2043-2050, XP002494170 ISSN: 1098-5336 [retrieved on 2008-02-08]	

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JEFFRIES T W ET AL: "Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 63, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 495-509, XP002999147 ISSN: 0175-7598 das ganze Dokument, insbesondere S. 497, linke Spalte, 1. Absatz	
A	VAN MARIS A J A ET AL: "Development of Efficient Xylose Fermentation in Saccharomyces cerevisiae: Xylose Isomerase as a Key Component" ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 108, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 179-204, XP008086128 ISSN: 0724-6145	
A	WARNICK THOMAS A ET AL: "Clostridium phytofermentans sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY,, vol. 52, no. 4, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 1155-1160, XP002536553	
A	WO 2007/089677 A (UNIV MASSACHUSSETS [US]; LESCHINE SUSAN [US]; WARNICK THOMAS A [US] UN) 9 August 2007 (2007-08-09)	
P,X	BRAT DAWID ET AL: "Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in Saccharomyces cerevisiae" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, no. 8, April 2009 (2009-04), pages 2304-2311, XP009121860 ISSN: 0099-2240 the whole document	1-25
P,X	WO 2008/141174 A (MASCOMA CORP [US]; HOGSETT DAVID A [US]; RAJGARHIA VINEET B [US]) 20 November 2008 (2008-11-20) das ganze Dokument, insbesondere Beispiele und Ansprüche	1-7,11, 12, 16-21, 24,25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/004762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03062430 A	31-07-2003	AT 418616 T	15-01-2009
		BR 0306740 A	28-12-2004
		CA 2474033 A1	31-07-2003
		CN 1703514 A	30-11-2005
		DK 1468093 T3	16-02-2009
		ES 2319757 T3	12-05-2009
		JP 2005514951 T	26-05-2005
		US 2008014620 A1	17-01-2008
US 6475768 B1	05-11-2002	AU 4136800 A	14-11-2000
		WO 0061733 A1	19-10-2000
WO 2007089677 A	09-08-2007	AU 2007210012 A1	09-08-2007
		CA 2640429 A1	09-08-2007
		EA 200870204 A1	28-04-2009
		EP 1984514 A2	29-10-2008
		JP 2009524432 T	02-07-2009
		KR 20080091257 A	09-10-2008
WO 2008141174 A	20-11-2008	EP 2064225 A2	03-06-2009

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/004762

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N5/10 C12N15/81 C12P7/10 C12R1/645 C12N9/92
C12P19/24

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N C12P C12R

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, COMPENDEX, EMBASE, MEDLINE, FSTA, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/062430 A (ROYAL NEDALCO B V [NL]; OP DEN CAMP HUBERTUS JOHANNES [NL]; HARHANGI H) 31. Juli 2003 (2003-07-31) das ganze Dokument, insbesondere die Ansprüche	1,2, 6-21,24, 25
X	ANTONIUS J A VAN MARIS ET AL: "Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status" ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, Bd. 90, Nr. 4, 11. Oktober 2006 (2006-10-11), Seiten 391-418, XP019446684 ISSN: 1572-9699 das ganze Dokument, insbesondere S.398-404 (Xylose fermentation).	1,2, 6-21,24, 25

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
27. August 2009	04/09/2009
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	**Bevollmächtigter Bediensteter** Bassias, Ioannis

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KUYPER M ET AL: "High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: The key to efficient ethanolic fermentation of xylose by Saccharomyces cerevisiae?" FEMS YEAST RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE, TOKYO, NL, Bd. 4, Nr. 1, 1. Oktober 2003 (2003-10-01), Seiten 69-78, XP002312913 ISSN: 1567-1356 das ganze Dokument, insbesondere Tabelle 1	1,2, 6-21,24, 25
X	KUYPER M ET AL: "Minimal metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle" FEMS YEAST RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE, TOKYO, NL, Bd. 4, Nr. 6, 1. März 2004 (2004-03-01), Seiten 655-664, XP002312911 ISSN: 1567-1356 das ganze Dokument, insbesondere Abb. 4 und 5	1,2, 6-21,24, 25
X	WALFRIDSSON M ET AL: "Ethanolic fermentation of xylose with Saccharomyces cerevisiae harboring the Thermus thermophilus xylA gene, which expresses and active xylose (glucose) isomerase" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 62, Nr. 12, 1. Dezember 1996 (1996-12-01), Seiten 4648-4651, XP002117639 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	1,2, 6-21,24, 25
X	US 6 475 768 B1 (OTERO RICARDO ROMAN CORDERO [ZA] ET AL) 5. November 2002 (2002-11-05) das ganze Dokument	1,2, 6-21,24, 25
A	WIEDEMANN BEATE ET AL: "Codon-optimized bacterial genes improve L-Arabinose fermentation in recombinant Saccharomyces cerevisiae" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 74, Nr. 7, 1. April 2008 (2008-04-01), Seiten 2043-2050, XP002494170 ISSN: 1098-5336 [gefunden am 2008-02-08]	

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/004762

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JEFFRIES T W ET AL: "Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, Bd. 63, 1. Januar 2004 (2004-01-01), Seiten 495-509, XP002999147 ISSN: 0175-7598 das ganze Dokument, insbesondere S. 497, linke Spalte, 1. Absatz	
A	VAN MARIS A J A ET AL: "Development of Efficient Xylose Fermentation in Saccharomyces cerevisiae: Xylose Isomerase as a Key Component" ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 108, 1. Januar 2007 (2007-01-01), Seiten 179-204, XP008086128 ISSN: 0724-6145	
A	WARNICK THOMAS A ET AL: "Clostridium phytofermentans sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY,, Bd. 52, Nr. 4, 1. Juli 2002 (2002-07-01), Seiten 1155-1160, XP002536553	
A	WO 2007/089677 A (UNIV MASSACHUSSETS [US]; LESCHINE SUSAN [US]; WARNICK THOMAS A [US] UN) 9. August 2007 (2007-08-09)	
P,X	BRAT DAWID ET AL: "Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in Saccharomyces cerevisiae" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 75, Nr. 8, April 2009 (2009-04), Seiten 2304-2311, XP009121860 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	1-25
P,X	WO 2008/141174 A (MASCOMA CORP [US]; HOGSETT DAVID A [US]; RAJGARHIA VINEET B [US]) 20. November 2008 (2008-11-20) das ganze Dokument, insbesondere Beispiele und Ansprüche	1-7,11, 12, 16-21, 24,25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/004762

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 03062430	A	31-07-2003	AT	418616 T	15-01-2009
			BR	0306740 A	28-12-2004
			CA	2474033 A1	31-07-2003
			CN	1703514 A	30-11-2005
			DK	1468093 T3	16-02-2009
			ES	2319757 T3	12-05-2009
			JP	2005514951 T	26-05-2005
			US	2008014620 A1	17-01-2008
US 6475768	B1	05-11-2002	AU	4136800 A	14-11-2000
			WO	0061733 A1	19-10-2000
WO 2007089677	A	09-08-2007	AU	2007210012 A1	09-08-2007
			CA	2640429 A1	09-08-2007
			EA	200870204 A1	28-04-2009
			EP	1984514 A2	29-10-2008
			JP	2009524432 T	02-07-2009
			KR	20080091257 A	09-10-2008
WO 2008141174	A	20-11-2008	EP	2064225 A2	03-06-2009