



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.16

(21) Номер заявки
201400877

(22) Дата подачи заявки
2013.02.07

(51) Int. Cl. **C12N 9/90** (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 19/24 (2006.01)

**(54) ЭУКАРИОТИЧЕСКАЯ КЛЕТКА, СОДЕРЖАЩАЯ БЕЛОК С
КСИЛОЗОИЗОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **12000783.6**

(32) **2012.02.07**

(33) **EP**

(43) **2015.01.30**

(86) **PCT/EP2013/052407**

(87) **WO 2013/117631 2013.08.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КЛАРИАНТ ПРОДУКТЕ
(ДОЙЧЛАНД) ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Драгович Здравко, Гамауф Кристиан,
Райзингер Кристоф, Кетлинг Ульрих
(DE)**

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) DATABASE Functional Gene Pipeline [Online], 30 December 2010 (2010-12-30), Munzy, D., et al.: "Eubacterium saburreum DSM 3986, Xylose isomerase; EC=5.3.1.5", XP002681255, retrieved from CME, Database accession no. NZ_AEPW01000073, the whole document, ZP_07904696, http://fungene.cme.msu.edu/gbnucdat a.jsp?seqAccno=NZ_AEPW01000073.1&seq_start=2583&seq_stop=3956&strand=1&format=Genbank

WO-A2-2012009272
WO-A1-2011078262

BRAT DAWID ET AL.: "Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*", APPLIED AND

ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, no. 8, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 2304-2311, XP009121860, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.02522-08, the whole document

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, vol. 4, no. 1, 1 October 2003 (2003-10-01), pages 69-78, XP002312913, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, NL, ISSN: 1567-1356, DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00141-7, cited in the application, the whole document

WO-A1-2010000464

EP-A1-1468093

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, vol. 108, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 179-204, XP008086128, SPRINGER, BERLIN, DE, ISSN: 0724-6145, the whole document

OLENA V. DMYTRUK ET AL.: "Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*", FEMS YEAST RESEARCH, vol. 8, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 165-173, XP008145122, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, NL, ISSN: 1567-1356, DOI: 10.1111/J.1567-1364.2007.00289.X [retrieved on 2007-07-27], the whole document

(57) Изобретение относится к эукариотической клетке, способной к ферментации ксилозо-содержащих субстратов. Клетка содержит белок, который обладает ксилозоизомеразной активностью и имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID № 8, при условии, что на его N-конце нет последовательности mktknniialkgdif. Кроме того, предлагается применение клетки для ферментации содержащей ксилосу биомассы, применение белка, полученного из клетки, для получения изомеризованных сахарных продуктов, и способ получения продукта ферментации биомассы с использованием клетки.

Область техники, к которой относится изобретение

Ксилоза является основной структурной единицей растительной биомассы, и присутствуя в ряде основных видов сырья, она находится в фокусе с точки зрения современных концепций получения биотоплива. Примеры таких богатых ксилозой материалов включают пшеничную солому, кукурузную солому или древесные опилки, или другие побочные продукты древесины (Blake A. Simmons et al. *Genome Biol.* 2008; 9(12):242).

В результате гидролиза исходного материала ферментативным, химическим или химико/ферментативным способом получают промежуточные продукты, богатые ксилозой, помимо других ценных сахаров (Deepak Kumar et al. *Biotechnol Biofuels.* 2011; 4: 27). Эффективная утилизация растворов, богатых C5-сахарами, в связанных линиях ферментации является критической и требует применения ферментирующих штаммов (Sara Fernandes and Patrick Murray, *Bioeng Bugs.* 2010; 1(6): 424). В частности, C6 дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, являющиеся основными перерабатывающими организмами, благодаря длительной селекции получившие такие признаки, как крайне высокая толерантность к этанолу и высокий выход при преобразовании глюкозы, оставляют ксилозу полностью интактной, таким образом снижая потенциальный выход. Известны некоторые стратегии, чтобы преодолеть это ограничение. Ключевым этапом кажется успешная обработка ксилозы путем изомеризации до ксилулозы, и последующий модификационный каскад не-восстановительной части C5 шунта до регулярного пути гликолиза *Saccharomyces cerevisiae*. В то время как поглощение ксилозы через мембрану посредством специфических транспортеров и достигаемую плотность потока через C5-шунт можно улучшить (David Runquist et al. *Microb Cell Fact.* 2009; 8: 49), ключевой этап изомеризации ксилозы в ксилулозу является главной проблемой всего способа. Известны два принципиальных пути для выполнения этапа. Во-первых, применение последовательных этапов восстановления ксилитола (ксилоредуктазой) и окисления (ксилитолдегидрогеназой) до ксилулозы вызывает основной дисбаланс между кофакторами НАДН и НАДФН и ведет к повышению образования ксилитола в условиях ферментации (Maurizio Bettiga et al. *Biotechnol Biofuels.* 2008; 1:16). Недостатком альтернативной прямой изомеризации путем применения ксилозоизомеразы является отсутствие генов ксилозоизомеразы в сочетании тем, что помимо этого потребуется достичь их активной экспрессии в эукариотических микроорганизмах (в частности, дрожжах, таких как *Saccharomyces cerevisiae*), высокой каталитической эффективностью, температурой и оптимальным рН, приспособленными к температуре ферментации и низкому ингибированию побочными продуктами, особенно ксилитолом. Одним аспектом настоящего изобретения является описание белковых последовательностей и нуклеиновых кислот, кодирующих их, для выполнения этого требования.

Ксилозоизомеразный путь является нативным для бактериальных видов и редко для дрожжей. В отличие от оксидоредуктазного пути, изомеразный путь не требует кофакторов. Изомеразный путь состоит, как минимум, из отдельных ферментов, гетерологичных ксилозоизомераз (XI), который напрямую превращают ксилозу в ксилулозу. Как с оксидоредуктазным путем, можно добиться дополнительного повышения выхода путем совместной экспрессии гетерологичной ксилулозокиназы (XK).

Первым геном, функционально экспрессирующим ксилозоизомеразу, был *xyIA* ген из анаэробных грибов *Piromyces* sp E2 (Kuiper M. et al. *FEMS Yeast Res.* 2003; 4(1): 69). Был создан гаплоидный дрожжевой штамм со способностью к ферментации ксилозы в качестве единственного источника углерода в анаэробных условиях. Большинство ксилозоизомераз являются бактериальными белками, и главным препятствием была их экспрессия в дрожжах. Однако в недавнем исследовании была продемонстрирована функциональная экспрессия в дрожжах (табл. 1). Из-за ключевого значения ксилозоизомеразной активности в концепции C5-ферментирующих организмов необходимо применять оптимальные ксилозоизомеразы. В предыдущих отчетах мы указывали, что ксилозоизомеразы *Clostridium phytofermentans* обеспечивают низкий, но наивысший доступный технический стандарт в этом отношении. Таким образом, необходимо улучшение полезных свойств ксилозоизомераз в объеме настоящего изобретения.

Таблица 1

Примеры ксилозоизомераз, заявленных в изобретении, у дрожжей

Организм-источник	Цитата
<i>Clostridium phytofermentans</i>	WO 2010/000464
<i>Piromyces</i> sp. E2	EP 1 468 093 B1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	US 2012 /0225451 A1
Неизвестный	WO2011078262
<i>Abiotrophia defectiva</i>	WO/2012/009272

Транспорт сахаров через мембрану не ограничивает ферментацию гексозных сахаров, хотя он может ограничивать метаболизм пентоз, особенно в случае одновременной ферментации гексозы и пентозы. Были проведены некоторые исследования по экспрессии транспортера пентоз.

Краткое изложение сущности изобретения

Задачей настоящего изобретения является обеспечение микробной эукариотической клетки, способной утилизировать C5 сахара, в частности ксилозу. Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение усовершенствованной белковой последовательности для обеспечения деградации C5 сахаров эукариотическими клетками.

Было неожиданно установлено, что белок, описанный SEQ ID № 2 (последовательностью, ранее опубликованной в NCBI GeneBank с номером доступа ZP_07904696.1) или укороченной на N-конце версией, лишенной первых 18 аминокислот (mktknniictialkgdif) (SEQ ID № 8), функционально экспрессируется в эукариотических микробных клетках, в частности дрожжах, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, когда эти клетки трансформируют вектором, несущим кассету экспрессии, содержащую ДНК последовательность, кодирующую указанную SEQ ID № 2, для белка, например ДНК молекулу, описанную SEQ ID № 1 (ранее опубликованную в GeneBank как часть номера доступа NZ_AEPW01000073.1 GI:315651683).

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность, предпочтительно 80% идентичность, более предпочтительно 90% идентичность, наиболее предпочтительно 95% идентичность с SEQ ID № 2 или SEQ ID № 8, и обладающий ксилосоизомеразной активностью в эукариотической клетке.

Настоящее изобретение также обеспечивает ДНК молекулу, содержащую ДНК последовательность, кодирующую белок из настоящего изобретения, где ДНК последовательность функционально связана с эукариотической регуляторной последовательностью.

Кроме того, было установлено, что трансформированные клетки демонстрируют повышенную скорость потребления ксилозы по сравнению с не трансформированными клетками. Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает эукариотическую клетку, экспрессирующую белок из настоящего изобретения и/или содержащую ДНК молекулу из настоящего изобретения.

В другом аспекте ферментация биомассы из среды, содержащей ксилозный источник углерода, улучшалась, а количество метаболитов, образованных такими трансформированными штаммами в этих условиях, повышалось, по сравнению с трансформированными контрольными организмами.

Другой аспект настоящего изобретения относится к биокаталитическим свойствам экспрессированного белка, и к его применению в качестве биокатализатора *in situ* или в очищенной форме для получения изомеризованных сахарных продуктов или промежуточных соединений.

Чертежи

Фиг. 1 - путь утилизации ксилозы.

Фиг. 2 - сравнение роста колоний *Saccharomyces cerevisiae*, трансформированных с *Eubacterium saburreum* (Es XI), *Piromyces* sp. (Pi XI) и *Clostridium phytofermentas* (Cp XI). В качестве отрицательного контроля использовали штамм, трансформированный простым вектором экспрессии pSCMB454 (вектор). 1 на шкале соответствует слабому росту спустя 6 суток, а 4 соответствует очень сильному росту спустя 6 суток.

Фиг. 3 - карта плазмид экспрессии дрожжей.

Фиг. 4 - плазида экспрессии для EsXI.

Фиг. 5 - сравнение роста культуры *Saccharomyces cerevisiae*, трансформированной с *Eubacterium saburreum* (Es-sh XI), и *Clostridium phytofermentas* (Cp XI). В качестве отрицательного контроля использовали штамм, трансформированный простым вектором экспрессии pSCMB454 (вектор).

Фиг. 6 - активность ксилосоизомеразы в клеточных экстрактах *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующих *Eubacterium saburreum* (Es-sh XI, ромбы) и *Clostridium phytofermentas* (Cp XI, круги). В качестве отрицательного контроля использовали штамм, трансформированный простым вектором экспрессии pSCMB454 (вектор). Формулы для линейных кривых ($Абс_{340\text{ нм}} = v \cdot \text{Время} + Абс_{3\text{ мин}}$) показаны под условными обозначениями. Для ясности только кривая построена для отрицательного контроля (вектор).

Фиг. 7 - удельная активность очищенных ксилосоизомераз: *Eubacterium saburreum* Es-sh XI и *Clostridium phytofermentas* Cp XI. В качестве отрицательного контроля использовали реакцию без фермента (только буферный раствор). Удельную активность выражали в % от превращенной ксилозы к ферменту при отношении фермента к субстрату (E/S) 0,05 мас. %.

Фиг. 8 - определение оптимального pH для очищенных ксилосоизомераз: *Eubacterium saburreum* (Es-sh XI, ромбы) и *Clostridium phytofermentas* (Cp XI, круги). В качестве отрицательного контроля использовали реакцию без фермента (буферный раствор, треугольники). Активность выражали в % от максимальной активности.

Фиг. 9 - определение оптимальной температуры для очищенных ксилосоизомераз: *Eubacterium saburreum* (Es-sh XI, ромбы) и *Clostridium phytofermentas* (Cp XI, круги). В качестве отрицательного контроля использовали реакцию без ферментов (буферный раствор, треугольники). Активность выражали в % от максимальной активности.

Фиг. 10 - определение Km для очищенных ксилосоизомераз: *Eubacterium saburreum* (Es-sh XI) и *Clostridium phytofermentas* (Cp XI).

Подробное описание изобретения

Определения.

Активность ксилосоизомераз в настоящем изобретении определяли в виде ферментативной активности фермента, принадлежащего к классу ксилосоизомераз (ЕС 5.3.1.5), таким образом катализирующего изомеризацию различных альдозных и кетозных сахаров и другие ферментативные побочные реакции, свойственные этому классу ферментов. Оценку принадлежности белка к классу ксилосоизомераз проводят либо на основе активности, или на основе гомологии, в зависимости от того, что является более су-

ществленным в каждом случае. Ксилозоизомеразную активность можно определить с применением связанного ферментативного фотометрического анализа с применением сорбитолдегидрогеназы.

Экспрессирующую конструкцию в настоящей заявке определяют, как последовательность ДНК, содержащую все необходимые элементы последовательности для обеспечения экспрессии содержащейся открытой рамки считывания (ОРС) в клетке-хозяине, включающей последовательности для инициации транскрипции (промоторы), терминации и регуляции транскрипции, сайты для инициации трансляции, участки для стабильной репликации или интеграции в геном хозяина и селектируемый генетический маркер. Таким образом, функциональный этап может быть уже установлен или достигнут в результате расположения (интеграции и т.д.) в клетке-хозяине. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующая конструкция содержит промотор, функционально связанный с открытой рамкой считывания, с последующей факультативной последовательностью терминации. Регуляторные последовательности для экспрессии в эукариотических клетках включают промоторные последовательности, участки связывания фактора регуляции транскрипции, последовательности для инициации и терминации трансляции. Регуляторные последовательности для экспрессии в эукариотических клетках означают ДНК или РНК, кодирующие участки, находящиеся в функциональной связи с процессами транскрипции и/или трансляции кодирующих цепей ДНК в эукариотических клетках, при соединении с кодирующими цепями ДНК по отдельности или в комбинации с другими регуляторными последовательностями. В настоящем изобретении рассматриваются промоторные последовательности, связанные с генами ксилозоизомеразы в соответствии с изобретением, таким образом обеспечивающие их экспрессию в выбранной эукариотической дрожжевой или грибковой клетке. Комбинация эукариотического промотора и ДНК последовательностей, кодирующих ксилозоизомеразу из настоящего изобретения, приводит к экспрессии ксилозоизомеразы в трансформированной эукариотической клетке. Предпочтительными промоторами являются промоторы *Saccharomyces cerevisiae* со средней или высокой активностью, активные в ферментативных условиях. Примерами таких предпочтительных промоторов являются промоторы гликолитического пути или транспорта сахаров, в частности промоторы генов, известных как PFK1, FBA1, PGK1, ADH1, ADH2, TDH3, а также их укороченные или мутантные варианты. Элементы для установки митохондрической стабильности известны в данной области техники и включают плазмидную точку начала репликации *S. cerevisiae* 2 км, центромерные последовательности (CEN), автономно-реплицирующуюся последовательность (ARS) или гомологичные последовательности любой длины для стимуляции хромосомной интеграции через путь соединения гомологичных концов. Избирательные маркеры включают генетические элементы, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам клетки-хозяина. Примерами являются гены *kan* и *ble* маркеров. Можно использовать маркеры ауксотрофии, дополняющие определенные виды ауксотрофии клетки-хозяина. В качестве примеров таких маркеров можно упомянуть гены и мутации, отражающие путь лейцина (LEU2) или урацила (URA3), но также ксилозоизомеразу.

Усиленное потребление ксилозы в настоящей заявке определяется как скорость потребления ксилозы, приводящая к росту и пролиферации клетки, образованию метаболитов и/или генерации энергии, повышенным по сравнению со скоростью потребления ксилозы в не модифицированной клетке (культуре), по отношению к рассматриваемой характеристике. Скорость потребления можно определить, например, феноменологически, путем рассмотрения сформированной клеточной плотности или размера колонии, путем определения скорости потребления кислорода, скорости образования этанола или путем прямого измерения концентрации ксилозы в ростовой среде в зависимости от времени. Потребление в этом контексте эквивалентно понятиям утилизации, ферментации или деградации.

Гены, вовлеченные в метаболизм ксилозы, описаны различными авторами и кодируют транспортеры гексоз и пентоз, ксилулокиназу, рибулозо-5-фосфат-3-эпимеразу, рибулозо-5-фосфат-изомеразу, транскетолазу, трансальдолазу и гомологичные гены.

Клетки, экспрессирующие ксилозоизомеразу, в настоящей заявке означают микробные эукариотические клетки, генетически модифицированные так, что несут экспрессирующие конструкции для экспрессии описанной ксилозоизомеразы. В предпочтительном варианте осуществления клетками, экспрессирующими ксилозоизомеразу, являются дрожжи, выбранные из группы из *Pichia*, *Pachysolen*, *Yarrowia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Arxula*, *Ashbya*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hartaeta*, *Kluyveromyces*, *Schwanniomyces*, *Trichosporon*, *Xanthophylomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, наиболее предпочтительно *Saccharomyces cerevisiae*.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает решения для генетического конструирования эукариотических клеток с усиленным метаболизмом ксилозы, улучшенным образованием биомассы в присутствии ксилозы и/или улучшенным образованием метаболитов. Это является необходимыми свойствами и представляет проблему для многих промышленных производственных штаммов, особенно производственных штаммов рода *Saccharomyces*, в том числе *Saccharomyces cerevisiae* в качестве не ограничивающего примера. Изобретение решает данную проблему путем обеспечения белка и последовательностей ДНК генов ксилозоизомеразы, которые функционально экспрессированы в низших эукариотических клетках, особенно дрожжевых, где указанным примером являются дрожжи рода *Saccharomyces*, в частности *Saccharomyces cerevisiae* в качестве не ограничивающего примера. Созданный штамм клетки, экспресси-

рующей ксилозоизомеразу, демонстрирует потенциально усиленное потребление ксилозы. Необходимое свойство ксилозоизомеразной активности, обеспечиваемое клеткой, экспрессирующей ксилозоизомеразу, трудно реализовать удовлетворительным образом с помощью средств, известных в данной области техники.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность, такую как по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно 85% идентичность, более предпочтительно 90% идентичность, наиболее предпочтительно 95% идентичность SEQ ID № 2 или SEQ ID № 8, и обладающий ксилозоизомеразной активностью в эукариотической клетке. В предпочтительном варианте осуществления белок состоит из такой аминокислотной последовательности, слитой с другой частью других белков, предпочтительно частями таких белков, демонстрирующих высокие уровни известных ксилозоизомераз, или демонстрирующих ксилозоизомеразную активность.

В предпочтительном варианте осуществления белок состоит из последовательности SEQ ID № 2 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 75% идентичность, предпочтительно 80% идентичность, более предпочтительно 90% идентичность, наиболее предпочтительно 95% идентичность SEQ ID № 2, и обладает ксилозоизомеразной активностью в эукариотической клетке.

Гомологичные белки также могут содержать укороченные белковые последовательности с сохраненной ксилозоизомеразной активностью. Отдельным примером таких укороченных белковых последовательностей являются SEQ ID № 8 или её варианты, демонстрирующие по меньшей мере 75, 80, 85, 90 или 95% идентичность к SEQ ID № 8.

Белок из настоящего изобретения или композиция, содержащая указанный белок, предпочтительно отличается от белка или композиции, полученной при экспрессии в прокариотической клетке. Таким образом, белок является, как правило, одним, полученным путем экспрессии в эукариотической клетке.

Белок из настоящего изобретения предпочтительно демонстрирует оптимальную ксилозоизомеразную активность в диапазоне pH от 7,5 до 8,5, при определении посредством способа, описанного в "Примерах".

Уровни идентичности можно определить с помощью компьютерной программы AlignX, поставляемой в Vector-NTI-Package от Life[™] Technology. Применяют установки по умолчанию в упаковочном компоненте в версии 10.3.0.

Специалисту в данной области техники понятно, что большое число различных молекул ДНК транслируется в одну и ту же белковую последовательность и охватывается настоящим изобретением как таковое. Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает молекулу ДНК, содержащую (предпочтительно состоящую из) последовательность ДНК, кодирующую белок в соответствии с изобретением, т.е. белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, такую как по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно 85% идентичность, более предпочтительно 90% идентичность, наиболее предпочтительно 95% идентичность с SEQ ID № 2, и обладающий ксилозоизомеразной активностью в эукариотической клетке, или предпочтительный вариант осуществления, как иллюстрировано выше, где последовательность ДНК функционально связана с эукариотической регуляторной последовательностью, т.е. регуляторной последовательностью, обеспечивающей экспрессию в эукариотической клетке. Не ограничивающие примеры последовательности ДНК приведены в SEQ ID № 1 или SEQ ID № 7. Известны способы вычисляемого усиления ДНК-последовательности по отношению к уровням продукции белка. Они включают способы применения статистической оценки предпочтительных кодонов (таблицы применения кодонов), алгоритмы прогнозирования вторичной структуры и статистические модели на основе НММ или NN, но не ограничиваются ими. Оптимизированные таким способом последовательности ДНК, рассчитанные из целевой белковой последовательности, являются предпочтительными и включены в настоящее изобретение. Также в настоящее изобретение включены последовательности ДНК, полученные путем этапов рекурсивного или не-рекурсивного мутагенеза и выбора или скрининга улучшенных вариантов. Это является обычной методикой для улучшения ДНК или белковых последовательностей, и последовательности, полученные такими способами, не могут быть исключены из концепции изобретения. Таким образом, неважно, обеспечивает ли итоговая последовательность ДНК в таком эксперименте интактную транслируемую белковую последовательность или приводит к мутациям в ней, если уровень идентичности не уменьшается ниже, чем предпочтительно 75, 80, 85, 90 или 95% с SEQ ID № 2 или SEQ ID № 8 соответственно. В предпочтительном варианте осуществления изобретения действительно применяют такие способы улучшения для приспособления описанных молекул нуклеиновых кислот и белковых последовательностей к конкретной проблеме.

Другой аспект настоящего изобретения относится к химерным последовательностям, генерируемым путем гибридизации частей последовательности ксилозоизомеразы из настоящего изобретения с частями других белков, предпочтительно частями белков, демонстрирующих высокие уровни идентичности с известными ксилозоизомеразными или демонстрирующими ксилозоизомеразную активность как таковую, а также к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим такие химерные белки. В качестве предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения могут быть выбраны гибриды N-концевой

части SEQ ID № 2 или SEQ ID № 8 белка или 5'-часть молекулы нуклеиновой кислоты SEQ ID № 1 или SEQ ID № 7. Авторам настоящего изобретения было известно, что этап изомеризации ксилозы, решаемый настоящим изобретением, является главным изменением, и что для установки эффективного потока углерода с ксилозой в качестве исходного звена может быть необходимой клетка, экспрессирующая ксилоизомеразу. Проблемы, известные авторам настоящего изобретения, включают трансмембранный транспорт, особенно поглощение из ростовой среды, фосфорилирование и метаболические этапы C5 шунта (неокислительной части пентозофосфатного шунта). Таким образом, дополнительные изменения, вносимые в клетку, особенно те, что отражают решение известных проблем и изменение уровней экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм ксилозы, представляют предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения. Порядок внесения таких изменений в клетки, которые можно выполнить последовательно или параллельно, произвольным или упорядоченным образом, здесь не различается, и все возможные стратегии рассматриваются как составная часть специальных вариантов осуществления изобретения.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает эукариотическую клетку, экспрессирующую белок из настоящего изобретения, и/или содержащую молекулу ДНК из настоящего изобретения. Белок предпочтительно состоит из последовательности SEQ ID № 2 или SEQ ID № 8. Эукариотическая клетка предпочтительно является дрожжевой клеткой, более предпочтительно выбранной из группы из *Pichia*, *Pachysolen*, *Yarrowia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Arxula*, *Ashbya*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hartaea*, *Kluveromyces*, *Schwanniomyces*, *Trichosporon*, *Xanthophylomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, наиболее предпочтительно является *Saccharomyces cerevisiae*. Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает генетически модифицированную дрожжевую клетку, содержащую экзогенный ген ксилоизомеразы, функциональный в указанной дрожжевой клетке, предпочтительно где экзогенный ген ксилоизомеразы функционально связан с промоторной и терминирующей последовательностями, функциональными в указанной дрожжевой клетке. В предпочтительном варианте осуществления экзогенный ген ксилоизомеразы является молекулой ДНК в соответствии с настоящим изобретением. Генетически модифицированная дрожжевая клетка предпочтительно выбрана из группы из *Pichia*, *Pachysolen*, *Yarrowia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Arxula*, *Ashbya*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hartaea*, *Kluveromyces*, *Schwanniomyces*, *Trichosporon*, *Xanthophylomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, предпочтительно является *Saccharomyces cerevisiae*.

Эукариотическую клетку, обладающую повышенными уровнями ксилоизомеразной активности, предпочтительно получают путем трансформации дрожжевого штамма дикого типа последовательностью ДНК из настоящего изобретения. Другой аспект изобретения относится к применению ксилоизомеразы из настоящего изобретения или клетки, экспрессирующей ксилоизомеразу из настоящего изобретения, для производства биохимикатов на основе сырьевого материала, содержащего ксилозу, такого как путем ферментации биомассы. Биохимикаты включают биотопливо, такое как этанол или бутанол, а также сырьевые материалы на биологической основе для химических веществ массового производства, таких как молочная кислота, итаконовая кислота в качестве некоторых примеров. Перечень возможных биохимикатов опубликован Министерством энергетики США. Белок из настоящего изобретения или клетку из настоящего изобретения можно применять в качестве биокатализатора *in situ* или в очищенной форме для получения изомеризованных сахарных продуктов или промежуточных соединений, предпочтительно для изомеризованных сахарных продуктов.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению фермента ксилоизомеразы, выделенного из эукариотического, особенно дрожжевого экспрессирующего хозяина, где указанная ксилоизомераза не содержит бактериальных контаминантов или фрагментированных бактериальных частиц. Возможное применение такой ксилоизомеразы включает пищевые и кормовые приложения, где присутствие упомянутых контаминантов даже при очень низком уровне создает риск для безопасности продукта. Вопросы, связанные с прямым применением *Eubacterium sabbreum* в качестве продуцирующего хозяина, должны быть решены в этой точке. Применение ксилоизомеразы в соответствии с настоящим изобретением в предполагаемом эукариотическом хозяине, предпочтительно дрожжевом, является особо предпочтительным.

Примеры

1. Идентификация потенциальных последовательностей генов с ксилоизомеразной функцией.

Для поиска ксилоизомеразных последовательностей в Genebank была выбрана программа BlastP (Stephen F. Altschul, et al., *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 3389-3402) на сайте NCBI для геномных последовательностей BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). В качестве запрашиваемой последовательности была выбрана опытная белковая последовательность из гена ксилоизомеразы (SEQ ID № 3) *Escherichia coli* K12. Стандартные параметры программы не были модифицированы, и запрос был проведен по базам данных бактериальных белков, включая базу данных *Eubacterium saburreum* DSM 3986, построенную на результатах определения последовательностей организма методом "дробовика" (номер доступа NZ_AEPW01000000). Учитывали последовательности со значительным уровнем гомологии по всей длине последовательности. При поиске был выявлен ряд возможных генов-кандидатов, которые затем клонировали в *S. cerevisiae* и тестировали их функциональную экспрессию. Все такие по-

тенциальные гены обрабатывали с вводом ZP07904696.1 (SEQ ID № 2), который является ксилозоизомеразой (EsXI) из *Eubacterium saburreum* DSM 3986, как описано в следующих абзацах. Ввод связанной кодирующей последовательности (NZ_AEPW01000073 REGION: 2583..3956: SEQ ID № 1) использовали в качестве основы для конструирования праймеров для клонирования.

2. Амплификация гена ксилозоизомеразы (EsXI) из *Eubacterium saburreum* DSM.

Способы манипуляции молекулами нуклеиновых кислот общеизвестны для специалистов в данной области техники и включены посредством ссылки (1. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Joseph Sambrook, David William Russell; 2. *Current Protocols in Molecular Biology*. Last Update: January 11, 2012. Page Count: approx. 5300. Print ISSN: 1934-3639). Геномную матрицу ДНК из *Eubacterium saburreum* DSM 3986 получали от DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen). Пары фланкирующих праймеров конструировали для соответствия с N- и C-концами SEQ ID № 1. Для амплификации укороченной на N-конце версии SEQ ID № 1 связывающий участок смыслового праймера сдвигали на 54 п.о. по ходу транскрипции (начиная от A55). ПЦР проводили с применением Finnzymes Phusiontm High Fidelity Polymerase (HF-Buffer system) в соответствии с рекомендациями поставщика по концентрациям дНТФ, праймера и буферного раствора. Амплификацию продуктов ПЦР осуществляли в термоциклере Eppendorf с применением стандартной программы для Phusion Polymerase (98°C, 30 мин исходной денатурации, с последующими 35 циклами из этапов 98°C (20 мин) -60°C (20 мин) - 72°C (1 ч 20 мин) и финальной фазой элонгации при 72°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР ожидаемого размера очищали путем препаративного гель-электрофореза на ТАЭ-агарозе с окраской бромистым этидием и извлекали из геля с применением Promega Wizard SV-PCR и Gel Purification Kit (набора для очистки на геле). Для гибридизации C-концевого 6xHis-Tag первичные продукты ПЦР использовали в качестве матрицы для повторной амплификации фрагмента цельной ДНК с применением удлиненного обратного праймера с соответствующим 5' удлинением, в идентичных условиях (ПЦР с гибридизацией 6xHis-Tag). Полученные продукты ПЦР вновь очищали путем электрофореза на агарозном геле и извлекали с применением Promega Wizard SV-PCR и Gel Purification Kit (набора для очистки на геле). Он содержал C-концевую версию 6x-His TAG foXI-гена или C-концевую версию 6x-His TAG (укороченного EsXT) Es-sh XI-гена соответственно.

Амплификацию кодон-оптимизированных генов ксилозоизомеразы проводили из оптимизированных матриц генов, полученных от Geneart Regensburg, Германия. Использовали алгоритмы оптимизации для оптимизации последовательностей в соответствии с указаниями компании.

3. Клонирование OPC EsXI и Es-shXI ORF в плазмиду экспрессии *Saccharomyces cerevisiae*.

Препарат плазмиды из pSCMB454 плазмиды, выделенной из культуры *Escherichia coli*, линеаризовали путем рестрикции с XmnI эндонуклеазой и полученные фрагменты отделяли от необработанных видов путем электрофореза на агарозном геле. Линеаризованную векторную основу извлекали из геля, следуя инструкциям Promega Wizard SV-PCR и Gel Purification Kit. Амплифицированный продукт ПЦР клонировали в XmnI переработанную векторную основу с применением стандартных способов клонирования. Трансформацию проводили в химически компетентные клетки *Escherichia coli* W Mach1 в соответствии с протоколом поставщика. Трансформанты выращивали в течение ночи на чашках LB-Ampicillin (лизогенный бульон с ампициллином) и тестировали правильность путем плазмидного Mini-ртер и контрольного расщепления, а также секвенирования ДНК. Большое количество плазмидной ДНК готовили из подтвержденного клона с применением Promega Pure YieldTM Plasmid Midiprep System. Примером последовательности итоговой кассеты экспрессии, включающей ГФД-промоторную последовательность и sus1 терминатор, является SEQ ID № 6.

4. Трансформация в *Saccharomyces cerevisiae*.

Штамм *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204667 (MATa, ura3-52, mal GAL+, CUP(r)) использовали в качестве хозяина во всех экспериментах по трансформации.

Трансформацию проводили с применением стандартных способов, известных специалистам в данной области техники (см., например, Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002) "Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/ PEG method", *Methods in Enzymology* 350: 87-96 ("Трансформация дрожжей посредством способа LiAc/ss носителя ДНК/ПЭГ")). Интактную версию ura3 гена *S. Cerevisiae*, содержащуюся в векторе экспрессии, применяли в качестве маркера селекции и трансформанты выбирали по росту на минимальной среде без урацила. Минимальная среда состояла из 20 г/л глюкозы, 6,7 г/л дрожжевой азотистой основы без аминокислот, 40 мг/л L-тирозина, 70 мг/л L-фенилаланина, 70 мг/л L-триптофана, 200 мг/л L-валина и 50 мг/л каждого из аденина гемисульфата, L-аргинина гидрохлорида, L-гистидина гидрохлорида моногидрата, L-изолейцина, L-лейцина, L-лизина гидрохлорида, L-метионина, L-серина и L-треонина. Значение pH доводили до 5,6 и добавляли 15 г/л агара для получения твердой среды.

5. Выращивание штаммов *Saccharomyces*, экспрессирующих ксилозоизомеразы, на ксилозной среде.

А) Отдельные колонии штаммов *Saccharomyces*, трансформированные вектором экспрессии для ксилозоизомеразы из *Eubacterium saburreum* (Es XI) и *Clostridium phytofermentas* (Cp XI), а также обычным вектором экспрессии pSCMB454, переносили на чашки с минимальной средой с ксилозой в качестве единственного источника углерода (20 г/л) и инкубировали при 30°C. Спустя 7 суток отмечен рост толь-

ко трансформантов с векторами экспрессии ксилозоизомеразы (фиг. 2).

Оценка среднего размера колоний штаммов *Saccharomyces*, экспрессирующих различные ксилозоизомеразы, показала, что наивысший эффект отмечался с Es XI, Cp XI и Pi XI имели схожий сильный эффект в этом физиологическом тесте, но эффект был значительно слабее, чем у Es XI. Отрицательный контроль, штамм *Saccharomyces*, трансформированный только pSCMB454 (обычным вектором), показал только слабый фоновый рост, неотличимый от фонового роста не трансформированных *Saccharomyces*.

В) Рост штаммов также оценивали на жидкой среде. На минимальную среду с 20 г/л ксилозы в качестве единственного источника углерода с рН, доведенным до 5,6, инокулировали единичные колонии. Спустя 7 суток культуры аликвотировали, хранили при -80°C и использовали в качестве исходных культур в экспериментах по выращиванию. Эксперименты по выращиванию проводили на той же самой минимальной среде и инокулировали исходные культуры. Инкубацию проводили в течение 10 суток во встряхиваемых флаконах при 250 об/мин, 30°C . Рост оценивали путем измерения ОП_{600 нм} (фиг. 5).

Как можно видеть на фиг. 5, рост штамма *Saccharomyces*, трансформированного Es XI, был слегка сильнее, чем рост штамма с Cp XI. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение по результатам анализа 3 встряхиваемых флаконов на штамм и указывают на статистическую значимость измерения.

6. Приготовление свободных экстрактов дрожжевых клеток.

Отдельные колонии штаммов *Saccharomyces*, экспрессирующих Es XI, Cp XI, переносили на минимальную среду, содержащую 20 г/л ксилозы, 6,7 г/л дрожжевой азотистой основы без аминокислот. Значение рН доводили до 5,6. Культуры инкубировали в аэробных условиях при 30°C , 250 об/мин в течение 7-10 суток. Клетки собирали путем центрифугирования и отмывали один раз стерильной водой при комнатной температуре, ресуспендировали в стерильной дистиллированной и деионизованной воде с ОП_{600 нм} >200 и замораживали при -80°C .

Замороженную клеточную суспензию оттаивали на льду и доводили до ОП_{600 нм}=200. 100 мкл буферного раствора NMDT (250 мМ NaCl, 10 мМ MnCl₂, 1 мМ ДТТ, 250 мМ Трис/HCl, рН 7,5) и 11 мкл PMSF раствора (100 мМ в изопропанол) добавляли к 1000 мкл клеточной суспензии. 500 мкл забуференной клеточной суспензии переносили в набор Precellys-Glass Kit 0,5 м (кат. номер #91 PCS VK05) и механически лизировали в Precellys 24 (Pqlab) гомогенизаторе. Лизис проводили 2 раза по 15 с при 5500 об/мин. Клеточный детрит удаляли путем центрифугирования при 13.200 г/4°C. Полученный лизат аликвотировали, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

7. Анализ для оценки ксилозоизомеразной активности.

А) Для некоторых измерений ксилозоизомеразной активности мы применяли спектрофотометрический анализ на основе сорбитолдегидрогеназы (СД). В качестве продукта ксилозоизомеразы образуется изомерный сахар ксилулоза. В ферментативном анализе определяли количество образованной ксилулозы. Для измерения изомеразной активности общих клеточных лизатов ферментативный анализ проводили в форме связанного XI-SD анализа (фиг. 6). Для всех других экспериментов ферментативный анализ проводили в два этапа, на первом этапе изомеризацию ксилозы, с последующим определением концентрации ксилулозы на втором этапе. В двухэтапном протоколе проводили инактивацию ксилозоизомеразы (95°C , 10 мин) после первого этапа. Состав смеси для ферментативного анализа приведен ниже.

Компоненты	Конечная концентрация
Трис-Cl, рН 7,5	100 мМ
MgCl ₂	10,5 мМ
MnCl ₂	10 мМ
ДТТ	1 мМ
НАДН	0,25 мМ
Сорбитолдегидрогеназа (Enzymstock, 100 Ед/мл) Sigma #S3764	2 Ед/мл
Ксилоза	1% (м/о)
Дистиллированная и деионизованная H ₂ O	/

Анализ проводили в 96-луночных планшетах и кинетику отслеживали при 340 нм.

Оценка ферментативной активности клеточных экстрактов *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующих различные XI (фиг. 6), показала, что наивысшая активность была получена с *Eubacterium saburum* XI. XI активность *Clostridium phytofermentas* была измеримой, и превышала фоновый уровень не содержащего ксилозоизомеразы клеточного экстракта, но была значительно ниже, по сравнению с двумя другими экстрактами.

В) Для некоторых анализов ксилозоизомеразной активности применяли способ на основе ВЭЖХ. Количество продуцируемой ксилулозы измеряли опосредованно, по снижению концентрации ксилозы (фиг. 7). Анализ проводили с H колонкой и прибором Dionex Ultimate 3000.

8. Экспрессия ксилозоизомеразы в *E. coli*, очистка ксилозоизомеразы и анализ активности.

Все ксилозоизомеразы экспрессировали в клетках *E. coli* K12 Top10 с арабинозо-индуцируемым промотором с применением стандартных методик молекулярной биологии. Экспрессию ксилозоизомераз индуцировали 0,02% арабинозой при 25°C и 200 об/мин в течение 14 ч. Культуры собирали путем цен-

трифугирования, удаляли надосадочную жидкость и клетки повторно суспендировали в 100 мМ фосфатном буферном растворе с pH 7,0 при ОП_{600 нм} от 200 до 300. Клетки лизировали посредством ультразвука в соответствии со стандартными способами очистки. Лизированные клетки центрифугировали в течение 30 мин при 20.000 g и 4°C. Очищенные надосадочные жидкости аликвотировали и замораживали при -80°C. Перед очисткой лизаты оттаивали на льду и добавляли имидазол до конечной концентрации 10 мМ. Очистку проводили на 500 мкл спин-колонках Ni-NTA (BioRad). Колонки уравнивали 100 мМ фосфатным буферным раствором с pH 7,0 и клеточные лизаты загружали на колонки. Колонки промывали 100 мМ фосфатным буферным раствором с pH 7,0 с 20 мМ имидазола и элюировали тем же самым буферным раствором, содержащим 250 мМ имидазола. Удаление имидазола и обмен буферного раствора с фосфатного на Трис-Cl проводили с колонками Micro Bio-Spin (BioRad) в соответствии с инструкциями производителя. ДСН-ПАГЭ анализ проводили на 10% гелях (Biorad Criterion XT) в соответствии с инструкциями производителя. Все белки были очищены до однородного состояния (>99%). Концентрацию белка определяли с реагентом Бредфорда от BioRad в соответствии с инструкциями производителя. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. Все очищенные белки были получены с конечной концентрацией около 2 г/л.

Исходный анализ активности очищенных белков проводили с итоговым способом на основе ВЭЖХ (см. выше). Анализ проводили при отношении фермента к субстрату (отношении E/S) от 0,05%, при 60°C и в течение 2 ч. После изомеризации реакционные смеси инактивировали, как описано ранее.

Анализ проводили для выяснения удельной активности очищенных ферментов. Как показано на фиг. 7, наивысшая удельная активность наблюдалась с ксилоизомеразой *Eubacterium saburreum* (11,9%). Самая низкая удельная активность была получена с ксилоизомеразой *Clostridium phytofermentas* (2,1%). Полученные данные соответствуют результатам определения активности ксилоизомеразы в неочищенных клеточных экстрактах. В обоих случаях две новые изомеразы, описанные в настоящем изобретении, обладали более высокой активностью, чем контрольная Ср XI.

9. Определение оптимального pH для очищенных ксилоизомераз.

Оптимальное значение pH для очищенных ксилоизомераз определяли с ферментативного анализа по конечной точке на основе сорбитолдегидрогеназы. Использовали описанный двухэтапный протокол. В качестве меры изомеразной активности использовали количество окисленного НАДН (НАД⁺; в виде снижения при 340 нм) в конечной точке реакции. Количество окисленного НАДН эквимолярно количеству молекул ксилулозы, образованных во время этапа изомеризации. Были предприняты меры, чтобы НАДН не истощался в каких-либо реакциях, используемых для определения оптимального pH. Использовали две буферные системы для определения оптимального pH: БисТрис для pH 5,5-7,5 и Трис для 7,5-9,5. Сравнение ферментативной активности в двух буферных системах проводили при pH 7,5. Не отмечено существенных различий.

Определенный оптимум pH, как показано на фиг. 8, продемонстрировал некоторые различия между контрольной Ср XI и двумя новыми XI, описанными в изобретении. Во-первых, оптимум pH для Ср XI является нейтральным (pH 7,0), а оптимум pH для Es XI и Ср XI находится в щелочной области (pH 8,0). Во-вторых, остаточная активность Es XI (pH 5,5) составляет 50% (нижняя стрелка) от максимальной активности. Остаточная активность Ср XI при pH 5,5 практически равна нулю. В-третьих, две новых формы ксилоизомераз образуют относительно широкий пик между pH 7,0 (>90%, верхняя стрелка) и pH 8,0 (=100%). По сравнению с ними, Ср XI сохраняет <80% активности при pH 8,0.

10. Определение оптимальной температуры для очищенных ксилоизомераз.

Температурный оптимум для очищенных ксилоизомераз определяли с ранее описанным ферментативным анализом в конечной точке. Так, в этом эксперименте принимали меры, чтобы НАДН не истощался в каких-либо реакциях, используемых при определении оптимальной температуры. Градиенты температуры генерировали с обычными лабораторными ПЦР циклерами (Eppendorf).

Определение оптимальной температуры (фиг. 9) выявило некоторые различия между контрольной Ср XI и Es XI, описанной в настоящем изобретении. Во-первых, температурный оптимум для Ср XI определяется с относительно широким пиком при 56,2°C. Es XI показала значительно более широкие пики в диапазоне от 53,8 до 61,6°C. Во-вторых, активность Es XI при 67°C составляет около 50%, а активность Ср XI практически равна нулю. Взяты вместе, данные по определению оптимальной температуры показали, что ксилоизомеразы из настоящего изобретения обладают значительно более высокой устойчивостью к температуре, чем контрольная Ср XI.

11. Определение K_m для очищенных ксилоизомераз.

Значения K_m определяли ферментативным анализом, описанным в предыдущих примерах. В эксперименте использовали ксилоизомеразы, очищенные из *E. coli*.

Определение K_m для очищенных ксилоизомераз показало K_m для Es-sh XI 18,4 мМ. Значение K_m для Ср XI составило 36,6 мМ (фиг. 10).

Список последовательностей

SEQ ID № 1. Последовательность из *Eubacterium sabbureum* DSM 3986, ДНК последовательность, кодирующая ксилосоизомеразу (NZ AEPW01000073.1 GL315651683).

gtgaaacaasaacattatgtactattgcattgaaggagacatattatgaaagaattttcccgcatatcacctgtaaagttgag
ggcagagatagtaaaatccacttagttcaaatattatgatccaaaagggtgataatgggcaaaacaatggaggaacattatcatttgctat
ggcatggcgataatctttgctgctgtggtggtgatgttcggacagggtactgctgataaaagtttgggaaagctccgctactatggag
catgcaaggcctaagtggtgacagcattgaattatgaaaaagcttgataaagtattattgctccatgatacggatattgtaacctgagga
tcaggagatataaatgttaccatgcacgttggatgagattacagactatacttagaaaaacaaggataccgatataaatgtctttgga
caacctgcaatatgtcagtaatacaagattatgaacggtgaggaagctcaaacagtcagatgtattttgctttgacggcgacagggcaa
agaaggtcttgaataatgcccgtaaaacttgagcaaaagggttattctggggagggcagagaagggtatgagacatttcaaatcacagat
atgaagcttgaagaggaaaatagcaaacctcttacaatgtgcagagattatggacgagatagcctttatgggagattttatattgagcc
taagccgaaggagcctatgaagcatcagatattttgatgctgcaactgcaatcggttttaagaaaataggactgataaagattcaaac
taaatattgagcaaatcacgctacactgacaggtcactttcagcatgagtaagagtatgctcagcaacggatgaggggctgctgaga
tgccaatcaaggagatacattctggatgggacactgatcaatccctacaatgtctatgatactacattggctatgataaattaaagggc
aggcggactccgctgaggtctgaacttgattcaagaatcgagaccaagtaatacagccgatgatattcttatggctttatagcggat
ggacacattgactggacttataagcggcgaaattatagaagacggaagaatagatattttgtaagaagatagcaagttataat
caggaataggaagaagataagaacaagaaagtgacactgatagagtgctccgagatgcccgaagcttaaaagcctgaactgccg
gaatcaggaagacaggaatcttgagagcgtagtgaataatattgttcggataa

SEQ ID № 2. Белковая последовательность транслированной последовательности ДНК из *Eubacterium sabbureum* DSM 3986, кодирующей ксилосоизомеразу (ZP_07904696.1) (EsXI).

mktkniiictialkgdifmkeffpgispvkfegrdsnplsfkydakrvmimgktmeehlsfamawwhnlcagvdmfmgqvtvdk
sfessgtmeharakvdagiefmkklgikyycfhdtdivpedqedinvtnarldeitdyilektdtdikclwtcnmfsnprfmnga
gssnsadvfcfaaaqakkglenavklgakgfvwggregyettlntdmkleeniattfmcrydgrsigfmgdfyiepkpkpkmkh
qydfdaataigflrkyglkdkfknianhatlaghtfqlhelrvcavngmmgsvdanqgdtdllgwdtdqfptnvdydtlamyeilkag
glrgglndfsknrrpsntadmfyfiagmdtfalglkaaeiiedgriddfvkeyasyngsigkknrkvltiecaeyaaklkpelp
esgrqeylesvvnnilfg*

SEQ ID № 3. Ксилосоизомераза *Escherichia coli* (белок).

mqaqyfdqdrvryegskssnplafhrhynpdelvlgkrmeehlrfaacywhfvcwngadmfgvafnrpqgpealalakraadv
afeffhklhvpfycfhdvdspegaskeyinnfaqmvdvlagkqeesgvklwgtancftnprygagaatnpdpevfswaatqvvt
ameathklggenvylwggregyettlntdlrereqlgrfmqmvvehkhkigfgtlliepkpkpethkqydydaatvygflkqfgle
keiklnieanhatlaghsfhheiatialglfsvdanrgdaqlgwdtdqfnpnsveenalvmyeilkagfttgglnfdakvrrqstdky
dlfyghigamdtmalalkiaarmedgeldkriaqrysgwnselgqqilkqmsladlakyaqehhlsphvqsgrqeqlenlvnhylf
dk*

SEQ ID № 4. Ксилосоизомераза из *Clostridium phytofermentas* (белок) (Ср XI).

mknyfpnvpevkyegpnstnpfakyydankvvagktmkehcrfalswwhtlcaggadpfgvttmdrtygnitdpmelakakvd
agfelmtklgieffchdadiapegdtfeesknlfeivdyiekmdqtgikllwgtannfshprfmhgastschADvfayaaakik
naldatiklggkyvfwggregyettlntdlgleldnarmkmaveygrangfdgdfyiepkpkpethkqydydaatvflrkygl
ekdfkmnieanhatlaghtfehelamarvngafgsvdanqgdplngwdtdqfptdvhstlamlevlkagftnglnfdakvrrgs
fefddiaygyiagmdtfalglkaaeiiddgriakfvddryasyktgigkaivdgtsleeeqyvltthsepvmsgrqevletivnnilfr
*

SEQ ID № 5: Ксилосоизомераза из *Piromyces* sp. (белок - PI_XI).

makeyfpqikikfegkdsknplafhydaekvmgkkmkdwlrfamawwhlcaegadqfgggktsfpwnegtdaieiakqk
vdagfeimqklgipyycfhdvdlvsegnsieeyesnlkavvaylkekqketgikllwstanvfghkrymngastnppdfvvaraiqv
iknaidagielgaenyvfwggregymsslntdqkrehatmltmardyarskgfkgftlliepkpkpethkqydydtetaigflka
hndkdfknieanhatlaghtfehelacavdagmlgsidanrgdyqngwdtdqfpidqyelvqawmeiirgggfvgtgtnfdaktr
mstdleiiiihavgmdamaralenaakllqespytkmkkeryasfdsgigkdfedgkltleqvyeygkkngepkqtsqkqelyeai
vamyq*

SEQ ID № 6. Кассета экспрессии EsXI (ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ: кодирующая последовательность из гена EsXI с С-концевым 6x-His-Tag и слияние с линкером; МАЛЫМИ ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ: ГФД-промотор; подчеркнуто: остатки XnmI сайта; курсив: СУС1 терминатор)

CTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTGATTTTCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGC
 CTTTTAATCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAAATAGGGGGCGGTTACACAGAATATATAACATCGTAGG
 TGCTGGGTGAACAGTTTATCTGGCATCCACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTAAAGCTGGCATCCAGA
 AAAAAAAGAATCCAGCACCAAAATATGTTTTCTTACCACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTAGC
 GCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGC
 CTGGAGTAAATGATGACASCAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCAATTTCTTACACCTTCTATTACC
 TTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAAGCAGTCCCTCAAATTTCCCTACT
 TGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATCTGTAATCTATTTCTAAACTTCTAAAT
 CTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTAGTTTTAAAAACCAAGAACTTAGTTTCGAATaaacacacagaacaag
aaaATGAAAACAAAAACAACATTATATGTACTATTGCATTGAAAGGAGACATAT
TTATGAAAGAATTTTTTCCCGGCATATCACCTGTAAAGTTTGAGGGCAGAGATA
GTAAAATCCACTTAGTTCAAATATTATGATGCCAAAAGGGTGATAATGGGCA
AACAATGGAGGAACATTTATCATTTGCTATGGCATGGTGGCATAATCTTTGTG
CCTGTGGTGTGGATATGTTCCGGACAGGGTACTGTCGATAAAAAGTTTTGGTGAA
AGCTCCGGTACTATGGAGCATGCAAGGGCTAAAGTGGATGCAGGCATTGAATT
TATGAAAAAGCTTGGTATAAAGTATTATTGCTTCCATGATACGGATATTGTACC
TGAGGATCAGGAAGATATAAATGTTACCAATGCACGTTTGGATGAGATTACAG
ACTATATCTTAGAAAAACAAGGATACCGATATTAATGTCTTTGGACAACCT
GCAATATGTTCAAGTAATCCAAGATTTATGAACGGTGCAGGAAGCTCAAAACAGT
GCAGATGATTTTGTCTTTCAGCGGCACAGGCAAAGAAAGGCTTTGAAAATGC
CGTAAAACCTGGAGCAAAGGGATTTGTATTCTGGGGAGGCAGAGAAGGTTATG
AGACACTTCTAAATACAGATATGAAGCTTGAAGAGGAAAATATAGCAACACTCT
TTACAATGTGCAGAGATTATGGACGCAGTATAGGCTTTATGGGAGATTTTTATA
TTGAGCCTAAGCCGAAGGAGCCTATGAAGCATCAGTATGATTTTGATGCGGCA
ACTGCAATCGGTTTTTTAAGAAAATATGGACTTGATAAAGATTTCAAACATAAT
ATTGAGGCAAATCACGCTACACTTGCAGGTCATACTTTTCAGCATGAGTTAAGA
GTATGTGCAGTCAACGGTATGATGGGGTCGGTAGATGCCAATCAAGGAGATAC
ATTACTTGGATGGGACACTGATCAATCCCTACAAATGTCTATGATACTACATT
GGCTATGTATGAAATATTAAGGCAGGCGGACTCCGTGGAGGTCTGAACTTTG
ATTCAAAGAATCGCAGACCAAGTAATACAGCCGATGATATGTTCTATGGCTTTA
TAGCAGGTATGGACACATTTGCACTTGGACTTATTAAGGCGGCGAAATTATA
GAAGACGGAAGAATAGATGATTTTGTAAAGAAAGATATGCAAGTTATAATTCA
GGAATAGGTAAGAAGATAAGAAACAGAAAAGTGACACTGATAGAGTGTGCCGA
GTATGCCGCAAAGCTTAAAAAGCCTGAACTGCCGGAATCAGGAAGACAGGAAT
ATCTTGAGAGCGTAGTGAATAATATATTGTTCCGGAGGATCTGGCCATCACCACC
ATCATCACTAAgttcgtctcgttagttatgtcaegttacattcaegcccccacatccgctcaaccgaaaaggaag
*gaghtagacaacctgaagctaggccctattatTTTTatagttatgttagtattaagaacgttatttatattcaaatTTTTctttttctgtac
 agagcgtgtacgcattgaacattatactgaaaaacttgcttgagaaggttttgggacgctcgaaggttaatttg*

SEQ ID № 7. Оптимизированная ДНК из *S. cerevisiae*, кодирующая укороченную версию Es-sh_XI с C-концевым слиянием 6х His TAG.

atgaaggaattctccaggtatccccagtaagttgaaggtagagattctaagaaccattgctcctcaagtactacgatccaagagagt
tattatgggtaagaccatggaagaacattgtctttgctatggcttggtggcataattgtgtgctgtgtgtgatgttcggtaaggtactg
ttgataagctttcgggtaactctctggtactatggaacatgctagagctaaagtgatgccggtattgaattcatgaagaagttgggtattaa
actactctccacgatactgatatcggtccagaagatcaagaagatatcaacgttaccaatgccagattggacgaaattaccgattacatctg
gaaaagactaaggacaccgatcaagtgtttggactactgtaacatgttctccaaccaagattcatgaacggctgctggttctctaattct
gctgatgtttttgctgctgctcaagctaaaaagggtttggaaaatgctgtaagtgggtgctaaggggtttgtttttggggtgtagag
aaggttacgaaactttgtgaacactgacatgaagttggaagaagaaacattgctactgttcaccatgtgtagagattacggtagatccatt
ggtttcaggggtattctacattgaacctaagccaaaagaacctatgaagcacaatcattttgatgctgctactgctattggttcttgaga
aagtatggtttgacaaggactcaagttgaacattgaagtaacatgctactttggctgctacattttcaacacgaattgagagttgtgct
gtcaatgggatgatgggtctgtgatgtaatacaaggtgatactttgtgggtgggatactgatcaattccaactaacgtttacgataccact
tgccatgtacgaaatttgaagctgggtggtttagaggtggtttaaacttgactctaagaacagaagaccatccaactgctgatgat
gttttacggttctgctggtatgatacttctgttgggttgattaaagccgccgaaattatgaagatggtagaattgatgactctgcaaa
gaaagatcgcctcttacaattccggtatcggaagaagatagaacagaaggttacctgatcgaatgcgctgaatatgctgtaaatgga
agaaccagaattgccagaatccggtatcggaagaagatagaacagaaggttacctgatcgaatgcgctgaatatgctgtaaatgga
cattaa

SEQ ID № 8. Укороченная на TV-конце Es-sh_XI из *Eubacterium sabbureum* DSM 3986.

mkeffpgispvkfegrsknplsfkyudakrvmgkmeehlsfamawwhnlcacgvdmfgqgtvdksgessgmtmeharakv
dagiefmklgikyycfhdtdivpededinvtarldeitdyilektdtdikclwttnmfnprfmngagssnsadvfcaaaqak
kglenavklgakgvfwggreyetllntdmkleeniattftmcrdygrsigfmgdfyiepkpkepmkhqydfdaataigflrkygl
dkdkflnieanhatlaghtfqhelrvcaavngmgsvdanqgdllgwtdqfptvnydttlamyeilkgglrgglndfsknrrpsnt
addmfygfiaagmdfalgliaaeiiedgriddfvkeryasynsgigkimirkvtliecaeyaaklkpelpesgrqeylesvvnnilfg
*

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Эукариотическая клетка, содержащая белок, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID № 8, и не содержащую на N-конце аминокислотной последовательности mktknniictialkgdif, причем белок обладает ксилосоизомеразной активностью в эукариотической клетке.

2. Эукариотическая клетка по п.1, в которой белок имеет оптимальную ксилосоизомеразную активность в диапазоне pH от 7,5 до 8,5.

3. Эукариотическая клетка, содержащая молекулу ДНК, кодирующую белок, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID № 8, и не содержащую на N-конце аминокислотной последовательности mktknniictialkgdif, при этом белок обладает ксилосоизомеразной активностью в эукариотической клетке, причем ДНК функционально связана с эукариотической регуляторной последовательностью.

4. Эукариотическая клетка по п.3, в которой молекула ДНК имеет последовательность SEQ ID № 7.

5. Эукариотическая клетка по любому из пп.1-4, являющаяся дрожжевой клеткой, выбранной из *Pichia*, *Pachysolen*, *Yarrowia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Arxula*, *Ashbya*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hartaeta*, *Kluveromyces*, *Schwanniomyces*, *Trichosporon*, *Xanthophylomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, в частности *Saccharomyces cerevisiae*.

6. Генетически модифицированная дрожжевая клетка, содержащая экзогенный ген ксилосоизомеразы, функциональный в указанной дрожжевой клетке, причем экзогенный ген ксилосоизомеразы функционально связан с последовательностями промотора и терминатора, которые обеспечивают в указанной дрожжевой клетке экспрессию белка, имеющего аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID № 8, и не содержащую на N-конце аминокислотной последовательности mktknniictialkgdif, при этом белок обладает ксилосоизомеразной активностью в указанной дрожжевой клетке.

7. Генетически модифицированная дрожжевая клетка по п.6, в которой экзогенный ген ксилосоизомеразы представлен молекулой ДНК, кодирующей белок, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID № 8, и не содержащую на N-конце аминокислотной последовательности mktknniictialkgdif, при этом белок обладает ксилосоизомеразной активностью в указанной дрожжевой клетке.

8. Генетически модифицированная дрожжевая клетка по п.6 или 7, выбранная из *Pichia*, *Pachysolen*, *Yarrowia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Arxula*, *Ashbya*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hartaeta*, *Kluveromyces*,

Schwanniomyces, Trichosporon, Xanthophylomyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, в частности Saccharomyces cerevisiae.

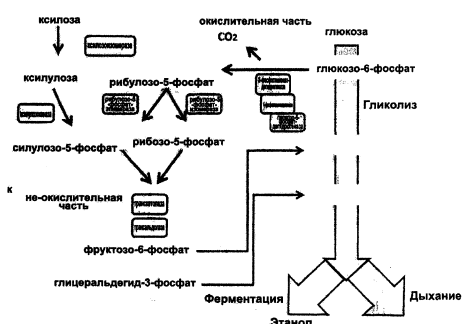
9. Применение клетки по любому из пп.1-8 для ферментации биомассы, содержащей ксилозу в качестве источника углерода.

10. Применение белка, полученного из клетки по любому из пп.1-8, при этом белок имеет аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% SEQ ID № 8, и не содержащую на N-конце аминокислотной последовательности mtkknniictialkgdif, при этом белок обладает ксилозоизомеразной активностью в эукариотической клетке в качестве биокатализатора in situ или в очищенной форме для получения изомеризованных сахарных продуктов или промежуточных соединений.

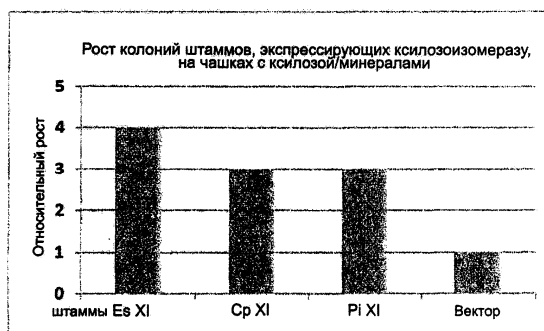
11. Применение по п.10 для получения изомеризованных сахарных продуктов.

12. Способ получения продукта ферментации, выбранного из молочной кислоты, уксусной кислоты, янтарной кислоты, аминокислот, 1,3-пропан-диола, этилена, глицерина, β-лактамных антибиотиков, цефалоспоринов, биотоплива, бутанола, этанола, итаконовой кислоты, где способ включает этап ферментации среды, содержащей источник ксилозы, с клеткой по любому из пп.1-8.

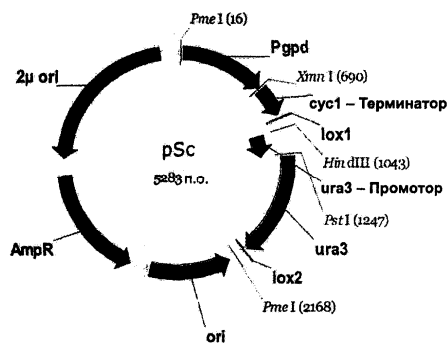
13. Способ по п.12, в котором продукт ферментации выбирают из бутанола или этанола и который дополнительно включает этап извлечения продукта ферментации.



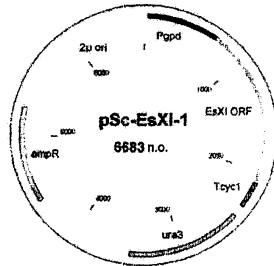
Фиг. 1



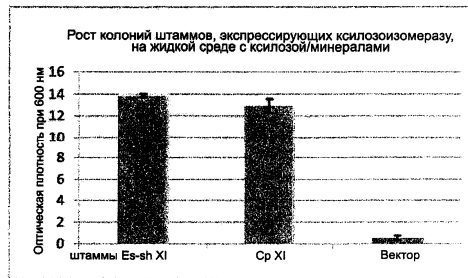
Фиг. 2



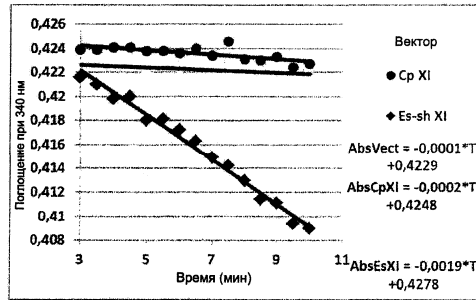
Фиг. 3



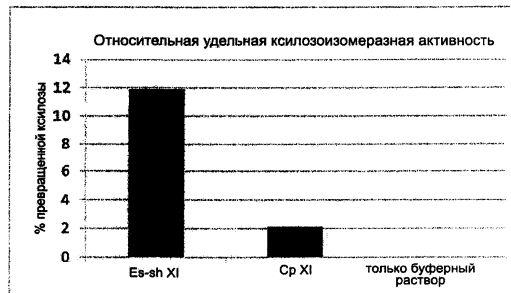
Фиг. 4



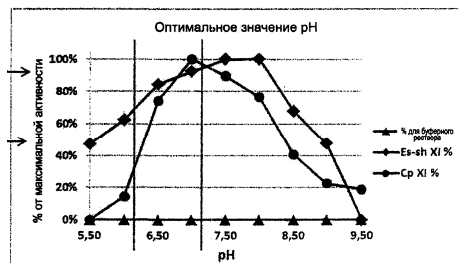
Фиг. 5



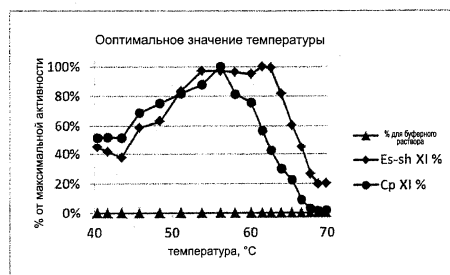
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

Ксилозоизомераза	Км (мМ)
Es-sh XI	18,4
Cp XI	36,6

Фиг.10