

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 726**

51 Int. Cl.:

C07K 14/395 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2001 E 01947666 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1297144**

54 Título: **Saccharomyces cerevisiae recombinante que expresa transportadores de glucosa quiméricos**

30 Prioridad:

29.06.2000 SE 0002460

17.11.2000 SE 0004241

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

05.09.2013

73 Titular/es:

CEREDUCE AB (100.0%)

Erik Dahlbergsgatan 11A

411 26 Goteborg, SE

72 Inventor/es:

BILL, ROSLYN;

BOLES, ECKHARD;

GUSTAFSSON, LENA;

HOHMANN, STEFAN;

LARSSON, CHRISTER y

ELBING, KARIN

ES 2 421 726 T3

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

DESCRIPCIÓN

Saccharomyces cerevisiae recombinante que expresa transportadores de glucosa quiméricos

La presente invención se refiere a una levadura que tiene propiedades de transporte de sacáridos, particularmente hexosa, modificadas y a su uso.

- 5 El fin de la invención es obtener una levadura que tiene propiedades de transporte de sacáridos, particularmente hexosa, modificadas mientras que simultáneamente se evita la producción de alcohol, en particular etanol en condiciones aerobias y altas concentraciones de sacáridos, particularmente hexosa.

La glucólisis de levaduras, la ruta que convierte azúcar en piruvato, tiene una capacidad masiva tal como se ha documentado por el hecho de que el 50-70% de la proteína celular de la levadura consiste en enzimas glucolíticas. De manera no sorprendente, esta ruta está controlada de un modo muy complejo y por diferentes mecanismos parcialmente redundantes (Fraenkel, 1982, Carbohydrate metabolism, págs. 1-37, en "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolism and gene expression" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Gancedo y Serrano, 1989, Energy-yielding metabolism, págs. 205-259, en "The Yeasts", Rose y Harrison (Eds.), segunda ed., vol. 3. Academic Press; Zimmermann y Entian, 1997, Yeast sugar metabolism, en "Biochemistry, genetics, biotechnology and applications", Technomic Publishing Co., Lancaster PA). Algunos de estos parecen estar compartidos con rutas glucolíticas de otros organismos hasta seres humanos y plantas superiores, pero otros parecen ser únicos para levaduras.

La regulación de la glucólisis de levaduras se produce mediante control alostérico de enzimas clave en la ruta tales como fosfofructocinasa (PFK) y piruvato cinasa (Blazquez *et al.*, 1993, FEBS Lett., 329, págs. 51-54; Boles *et al.*, 1996, Mol. Microbiol., 20, págs. 65-76; Campbell-Burk y Shulman, 1987, Ann. Rev. Microbiol., 41, págs. 595-616; Davies y Brindle, 1992, Biochemistry, 31, págs. 4729-4735; Gancedo y Serrano, 1989, citado anteriormente; Heinisch *et al.*, 1996, J. Biol. Chem., 271, págs. 15928-15933). Durante mucho tiempo, se consideró que la PFK era la (única) etapa limitante de la velocidad en la glucólisis. El desarrollo de la teoría de análisis del control metabólico ha mostrado que esto es una simplificación excesiva (Fell, 1997, en "Understanding the Control of Metabolism", Portland Press, Londres y Miami).

Un mecanismo de control que es probablemente específico para levaduras pero de importancia central funciona al nivel de la hexocinasa e implica metabolismo de trehalosa (Thevelein y Hohmann, 1995, Trends Biochem. Sci., 20, págs. 3-10). La inactivación de trehalosa-6-fosfato sintasa provoca una ausencia de acumulación de trehalosa, pero también un defecto de crecimiento, específicamente cuando se hace crecer sobre glucosa (González *et al.*, 1992, Yeast, 8, págs. 183-192; Van Aelst *et al.*, 1993, Mol. Microbiol., 8, págs. 927-943). La expresión de trehalosa-6-fosfato sintasa heteróloga en un mutante de *S. cerevisiae* que carece de la misma enzima restauró los niveles de trehalosa-6-fosfato así como el crecimiento sobre glucosa y el flujo de entrada de glucosa, al menos parcialmente (Bonini *et al.*, 2000, Biochemical Journal, 15, págs. 261-268).

También otros metabolitos y/o cometabolitos tales como ATP, ADP, NAD⁺ y Pi pueden estar implicados a diferentes niveles tales como el control alostérico y el denominado "control termodinámico" (alternativamente "concentración" o "control por metabolitos") (Gancedo y Serrano, 1989, citado anteriormente). Se ha encontrado una correlación "negativa" fuerte entre el contenido en ATP y el flujo glucolítico, que apunta a un control alostérico del flujo. En un estudio reciente se ha mostrado que la diana para la inhibición por ATP en células permeabilizadas estaba principalmente al nivel de fosfofructocinasa y piruvato cinasa (Larsson *et al.*, 2000, Yeast, 16, págs. 797-809).

La alteración de la expresión de genes que codifican para enzimas glucolíticas y la proteólisis de enzimas glucolíticas son otros niveles de regulación y control, lo que está lejos de lo que se entiende cuando se considera el control glucolítico (Hohmann, 1997, págs. 187-211, en "Yeast sugar metabolism. Biochemistry, genetics, biotechnology and applications", Zimmermann y Entian (Eds.), Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA; Larsson *et al.*, 1997, J. Bacteriol., 179, págs. 7243-7250).

La levadura *S. cerevisiae* tiene una flexibilidad metabólica notable y es una de las pocas levaduras que puede crecer de manera fermentativa en condiciones anaerobias estrictas (Visser *et al.*, 1990, Appl. Environ. Microbiol., 56(12), págs. 3785-3792). Durante condiciones aerobias y con simultáneamente concentraciones de glucosa externas relativamente altas, se ejerce el efecto de Crabtree, que da como resultado la producción de etanol también durante el crecimiento aerobio sobre azúcares fermentables (Fraenkel, 1982, citado anteriormente; Gancedo y Serrano, 1989, citado anteriormente). Se han propuesto varias causas del efecto de Crabtree. En primer lugar, se ha sugerido que el aumento de los niveles extracelulares (o intracelulares) de glucosa provoca la represión de la actividad de elementos clave de la ruta respiratoria conduciendo en su lugar a procesamiento mediante la ruta de fermentación. Explicaciones alternativas sugieren que el efecto puede producirse simplemente a través de la sobrecarga de la ruta glucolítica conduciendo a una derivación de las fuentes de carbono a procesos fermentativos.

Tal como se mencionó anteriormente, la represión por glucosa (= represión por catabolitos (carbono)) puede ser parte de la explicación de la producción aerobia de etanol durante el crecimiento sobre azúcares fermentables

(Fraenkel, 1982, citado anteriormente; Gancedo y Serrano, 1989, citado anteriormente; Gancedo, 1992, Eur. J. Biochem., 206, págs. 297-313). El efecto primario de la represión por glucosa es que la glucosa y fructosa son las fuentes de carbono preferidas si está disponible una mezcla de diferentes fuentes. Hay una serie completa de genes implicados en la represión por glucosa y el grado de represión se correlaciona con la capacidad de captación de glucosa. Esto sugiere que la tasa de utilización de glucosa determina la intensidad de la señal de glucosa relevante (Gancedo, 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, págs. 334-361).

Sin embargo, se ha propuesto que la concentración de glucosa extracelular (o intracelular), en vez del flujo de glucosa, desencadena la represión por glucosa (Meijer *et al.*, 1998, J. Biol. Chem., 273, págs. 24102-24107). Si se detecta la glucosa en el interior de la célula, entonces los transportadores pueden tener un papel indirecto no sólo en la generación de la señal inicial sino también en el mantenimiento de una señal de este tipo (Reifenberger *et al.*, 1997, Eur. J. Biochem., 245, págs. 324-333; Walsh *et al.*, 1994, J. Bacteriol., 176, págs. 953-958).

Se ha mostrado recientemente que la concentración de glucosa intracelular es mucho más alta que la notificada anteriormente, es decir, de aproximadamente 1,5 mM. Esta concentración es suficiente para reducir el flujo de entrada de glucosa en un 50% (Teusink *et al.*, 1998, J. Bacteriol., 180, págs. 556-562). Los autores de este estudio concluyeron que la glucosa intracelular es un fuerte candidato para la regulación de la importación de glucosa y por tanto de la glucólisis.

Durante concentraciones de azúcar externas diferentes, las células de levadura presentan sistemas de captación de azúcar de alta (K_m de aproximadamente 1-3 mM) o baja (K_m de aproximadamente 10-50 mM) afinidad (Bisson y Fraenkel, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, págs. 1730-1734; Walsh *et al.*, 1994, citado anteriormente). Las células que crecen en medios con baja concentración de glucosa presentan a menudo tanto un componente de alta afinidad como un componente de baja afinidad (Bisson y Fraenkel, 1983, citado anteriormente). La glucosa se transporta al interior de la célula de levadura mediante difusión facilitada a través de diferentes proteínas portadoras específicas (Bisson *et al.*, 1993, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 28, págs. 259-308).

Estudios genéticos han implicado a una familia génica, la familia *HXT*, que incluye 20 genes homólogos, en la codificación de transportadores de hexosa (Kruckeberg, 1996, Arch. Microbiol., 166, págs. 283-292; Diderich *et al.*, 1999, J. Biol. Chem., 274, págs. 15350-15359; Ozcan y Johnston, 1999, Microbiol. Mol. Biol., 63, págs. 554-569). La familia *HXT* pertenece a la superfamilia de facilitadores principal (Pao *et al.*, 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, págs. 1-34). Diferentes miembros de la familia se expresan a diferentes niveles dependiendo de la concentración de glucosa externa (Diderich *et al.*, 1999, citado anteriormente). *HXT1* se induce por altas concentraciones de glucosa, mientras que *HXT2*, *HXT4* y *HXT6-7* se inducen a bajas concentraciones de glucosa y *HXT3* se induce independientemente de la concentración de glucosa. Además, la transcripción de *HXT1-7* se correlaciona con la concentración de glucosa extracelular. También otras condiciones, tales como la disponibilidad de nitrógeno y la aerobiedad/anaerobiedad afectan a la expresión de miembros de la familia *HXT* (Reifenberger *et al.*, 1995, Mol. Microbiol., 16, págs. 157-167; Reifenberger *et al.*, 1997, citado anteriormente; Diderich *et al.*, 1999, citado anteriormente).

La familia *HXT* también incluye *GAL2* que codifica para un transportador de galactosa, que también transporta glucosa, y *SNF3* y *RG2*, que codifican para supuestos sensores de altas y bajas concentraciones de glucosa, respectivamente (Diderich *et al.*, 1999, citado anteriormente; Ozcan y Johnston, 1999, citado anteriormente). Las supuestas proteínas sensoras sirven probablemente como receptores de glucosa y contienen colas C-terminales inusualmente largas que se predice que están en el citoplasma (Ozcan *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, págs. 12428-12432; Ozcan *et al.*, 1998, EMBO. J., 17, págs. 2566-2573).

La modificación de *Saccharomyces cerevisiae* construyendo constructos de ADN que comprenden un gen *HXT*, en particular usando genes *HXT1* y/o *HXT3*, para aumentar la producción de etanol, en particular para producir bebidas alcohólicas y licor, se conoce anteriormente del documento EP-A-0 785 275.

Sin embargo, no se conocen levaduras *Saccharomyces* que produzcan poco o nada de alcohol en condiciones aerobias mientras que todavía presentan crecimiento.

Durante varios miles de años se han usado levaduras para la preparación de bebidas alcohólicas y en el futuro este proceso podría hacerse incluso más importante para la producción de etanol como combustible renovable. Sin embargo, muchos más productos distintos de alcohol pueden producirse potencialmente por levaduras a partir de fuentes renovables. Por ejemplo, podrían producirse otras sustancias valiosas tales como productos químicos finos, bebidas no alcohólicas y compuestos homólogos y/o heterólogos tales como proteínas o metabolitos de bajo peso molecular, y en muchos casos se producen.

Con el fin de competir satisfactoriamente con procedimientos de producción basados en otras técnicas, por ejemplo usando material de partida fósil (tal como petróleo, que puede usarse como base para producir algunos productos, por ejemplo productos químicos finos), se requiere el mayor rendimiento posible. Un posible problema es que las fuentes de carbono "buenas" tales como glucosa provocan a menudo represión de genes requeridos para la síntesis de la sustancia deseada. Como resultado, el rendimiento será bajo o el producto puede incluso no formarse. Para superar, o al menos minimizar, estos efectos, se emplean a menudo diferentes técnicas de

cultivo tales como cultivo de alimentación discontinua o crecimiento en quimiostato, lo que evita aumentos generales en la concentración de la fuente de carbono, por ejemplo glucosa, que podrían conducir a represión.

5 Sin embargo, se ha descubierto ahora sorprendentemente que mediante la modificación apropiada de las capacidades de transporte de sacáridos de la levadura, puede evitarse el procesamiento a través de la ruta de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*, incluso en presencia de altas concentraciones de sacárido como fuente de carbono, por ejemplo azúcares fermentables tales como glucosa, pero con el mantenimiento de un buen crecimiento y consumo de la fuente de carbono. Ningún otro trabajador en el campo ha producido levaduras con tales propiedades ventajosas.

10 La presente invención ofrece por tanto una solución a los problemas existentes de procesamiento a través de la ruta fermentativa en condiciones aerobias y altos niveles de sacáridos puesto que las levaduras que contienen los constructos de la invención parecen estar libres del efecto de Crabtree, por ejemplo libres de la represión por glucosa. Por tanto, si está en gran medida ausente la fermentación (por ejemplo mediante la ausencia de represión por glucosa), pueden obtenerse altos rendimientos de diferentes sustancias sin recurrir a técnicas de cultivo sofisticadas.

15 La presente invención se refiere por tanto a cepas que no producen etanol de *Saccharomyces cerevisiae* que tienen propiedades de transporte de hexosa específicas, mediante las cuales cambios en el gen de transporte de hexosa proporcionan un modo de obtener dicha propiedad de no producir etanol.

20 La invención descrita en el presente documento se refiere por tanto particularmente a un constructo quimérico entre transportadores de sacáridos, por ejemplo glucosa y/o galactosa (preferiblemente glucosa), en particular entre un transportador de hexosa de alta (por ejemplo HXT7) y uno de baja (por ejemplo HXT1) afinidad de la levadura *Saccharomyces*, preferiblemente *S. cerevisiae*.

25 Aparte de procedimientos tradicionales tales como la producción de levadura de panadería, las aplicaciones industriales también incluyen la producción de sustancias homólogas y/o heterólogas tales como proteínas o metabolitos de bajo peso molecular, así como productos químicos finos y a granel, productos alimenticios incluyendo extractos de levadura, un alimento funcional y agentes terapéuticos. Otra área de aplicación es la producción de bebidas no alcohólicas fermentadas.

30 Por tanto, la presente invención proporciona una levadura *Saccharomyces* modificada tal como se define a continuación que produce niveles inferiores de alcohol, en particular etanol, que la levadura de tipo natural en condiciones aerobias y concentraciones de sacáridos de 5 mM o más, preferiblemente glucosa al 2%, y que presenta una tasa de crecimiento de al menos el 30% de la de la levadura de tipo natural.

Establecido alternativamente, la presente invención proporciona una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* tal como se define a continuación que tiene propiedades de transporte de hexosa modificadas, que no produce etanol en crecimiento aerobio y altas concentraciones de hexosa. Preferiblemente, dicha *Saccharomyces cerevisiae* expresa sustancias heterólogas y/o homólogas tal como se describe a continuación en el presente documento.

35 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada que produce niveles inferiores de etanol que la levadura de tipo natural en condiciones aerobias y concentraciones de sacáridos de 5 mM o más y que presenta una tasa de crecimiento de al menos el 30% de la de la levadura de tipo natural, conteniendo dicha levadura una secuencia de nucleótidos quimérica (un constructo quimérico) que se transforma de manera estable en el material genético de la levadura, en la que el constructo
40 comprende una secuencia que tiene la forma

A – B

en la que

A es una primera secuencia que comprende las bases de nucleótidos w a x;

B es una segunda secuencia que comprende las bases de nucleótidos (x+y) a z;

45 en la que

A es de una secuencia de nucleótidos que codifica para un transportador de sacáridos de baja afinidad HXT-1 o HXT-3 de la levadura *Saccharomyces* o una secuencia que se hibrida con la secuencia codificante en condiciones de unión no rigurosas de 6 x SSC/formamida al 50% a temperatura ambiente y lavado en condiciones de alta rigurosidad o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la secuencia codificante o una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente

50

y

B es de una secuencia de nucleótidos que codifica para un transportador de sacáridos de alta afinidad HXT-2, 4, 6, 7 o GAL2P de la levadura *Saccharomyces* o una secuencia que se hibrida con la secuencia codificante en

condiciones de unión no rigurosas de 6 x SSC/formamida al 50% a temperatura ambiente y lavado en condiciones de alta rigurosidad o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la secuencia codificante o una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente

y

- 5 los valores w y x son las posiciones de nucleótidos primera y segunda dentro de la secuencia de nucleótidos de dicho transportador de sacáridos de baja afinidad y (x+y) y z son las posiciones de nucleótidos primera y segunda dentro de la secuencia de nucleótidos de dicho transportador de sacáridos de alta afinidad, y;

w es de 1 a 50;

x es un número desde 400 hasta 900;

- 10 y es inferior a 3; y

z es de desde 1600 hasta 1713,

produciendo dicha levadura menos del 50% de etanol en comparación con la levadura de tipo natural.

- 15 Dicha levadura produce menos del 50%, por ejemplo menos del 30, el 20 o el 10% de alcohol (particularmente etanol), de manera especialmente preferible menos del 5%, por ejemplo menos del 3, el 2 o el 1% de alcohol (particularmente etanol) en comparación con el tipo natural. Convenientemente, esto puede corresponder a niveles de alcohol (preferiblemente etanol) inferiores a 0,6 g/l, por ejemplo inferiores a 0,25 g/l, de manera especialmente preferible, inferiores o iguales a 0,15 g/l, por ejemplo inferiores o iguales a 0,12 g/l, en las condiciones de ensayo.

- 20 Preferiblemente, dicha levadura presenta un tiempo de generación de al menos el 30%, el 35, el 40, el 45, el 50, el 60, el 70 o el 80% (preferiblemente al menos el 60, el 70 o el 80%) en relación con la levadura de tipo natural, por ejemplo un tiempo de generación de menos de 4,5 h, por ejemplo menos de 3,9, 3,5 o 3,0 h o una tasa de crecimiento equivalente.

- 25 En una característica particularmente preferida por tanto, la presente invención proporciona una levadura *Saccharomyces* modificada tal como se definió anteriormente que produce menos de o igual a 0,15 g/l de alcohol (en particular etanol) en condiciones aerobias y concentraciones de sacáridos de 5 mM o más, preferiblemente glucosa al 2%, y que presenta una tasa de crecimiento de más del 50% de la de la levadura de tipo natural.

- 30 La levadura modificada de la invención puede presentar un consumo de glucosa reducido, por ejemplo inferior al 50%, por ejemplo inferior o igual al 40% menos que la levadura de tipo natural, por ejemplo inferior a 5 mmol de glucosa/(g de biomasa.h), pero preferiblemente consume más del 20%, por ejemplo más del 30, el 40 o el 50% en comparación con el tipo natural.

El rendimiento de crecimiento de las levaduras de la invención es de al menos el 30%, por ejemplo de desde el 30 hasta el 120%, por ejemplo más del 40 o el 50%, preferiblemente más del 60, el 80 o el 100% del de la levadura de tipo natural, por ejemplo más de 0,20, por ejemplo más de 0,35, 0,40 o 0,50 g de biomasa/g de glucosa.

- 35 Preferiblemente el consumo de oxígeno de las levaduras de la invención se mejora en relación con la levadura de tipo natural, es decir, es al menos el 100%, preferiblemente al menos el 150, el 175 o el 200% en relación con la levadura de tipo natural, por ejemplo más de 2, 2,5, 3 ó 4 mmol de O₂/(g de biomasa.h).

De manera especialmente preferible, las levaduras de la invención presentan propiedades de transporte de sacáridos, por ejemplo hexosa, por ejemplo glucosa modificadas. El transporte de otros sacáridos, particularmente galactosa y/o maltosa, también puede verse afectado.

- 40 La alteración de las propiedades de transporte de sacáridos de la levadura se logra convenientemente introduciendo moléculas exógenas relacionadas con moléculas de transporte que se producen de manera natural. De manera especialmente preferible, pueden generarse constructos quiméricos entre porciones de moléculas transportadoras conocidas e incorporarse en células de levadura y de ese modo afectar a su tráfico de sacáridos y a su uso de las rutas de fermentación y respiratoria en condiciones aerobias.

- 45 La familia Hxt y otros transportadores de sacáridos tienen una topología muy similar y son proteínas con 12 dominios transmembrana. Se ha encontrado ahora que la combinación de porciones de diferentes moléculas proporciona moléculas transportadoras funcionales que presentan propiedades de transporte alteradas. Sin querer restringirse a la teoría, parece que tales quimeras dan como resultado desrepresión por glucosa conduciendo por tanto a un uso potenciado de la ruta respiratoria y por tanto a una producción de alcohol reducida.

- 50 Tal como se describe a continuación en el presente documento en más detalle, se han producido diversas moléculas quiméricas y se han integrado en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. En particular, se describen el

desarrollo y las pruebas de 2 levaduras modificadas que contienen constructos quiméricos entre porciones de HXT1 y HXT7.

En el caso de la primera levadura modificada (KOY.TM6 también denominada en el presente documento KOY.TM6P), la fusión entre los dos genes se ha efectuado en la región que codifica para la región transmembrana 6 (TM6). Esta cepa, KOY.TM6P, muestra propiedades desreprimidas durante el crecimiento sobre glucosa en presencia de oxígeno, es decir, sólo se forman cantidades mínimas de etanol (menos de 0,12 g/l durante el crecimiento sobre glucosa al 2%). Simultáneamente, se obtiene una tasa de crecimiento relativamente alta con un tiempo de generación de 3,8 h, una tasa de consumo de azúcar de 3,1-3,9 mmol/(g de biomasa.h) y un rendimiento de crecimiento de 0,41 g de biomasa/g de glucosa.

La segunda levadura modificada, KOY.TM4 (también denominada en el presente documento KOY.TM4P) contiene un constructo en el que los genes se han unido en la región que codifica para la región transmembrana 4. Esta levadura modificada muestra propiedades de crecimiento muy similares a las observadas para KOY.TM6. Tiene una tasa de crecimiento con un tiempo de generación de 3 a 3,9 h y un rendimiento de 0,34 g de biomasa/g de glucosa.

Por tanto, las levaduras de la invención contienen una secuencia de nucleótidos quimérica (un constructo quimérico), tal como se define a continuación en el presente documento, que se transforma de manera estable en el material genético de la levadura, en la que el constructo comprende 2 o más secuencias de ácido nucleico que codifican para diferentes transportadores de sacáridos, por ejemplo glucosa y/o galactosa (preferiblemente glucosa), es decir, el constructo comprende al menos una primera secuencia a partir de la secuencia de nucleótidos que codifica para un primer transportador de sacáridos (o una secuencia relacionada con o derivada de la misma) y una segunda secuencia a partir de la secuencia de nucleótidos que codifica para un segundo transportador de sacáridos diferente (o una secuencia relacionada con o derivada de la misma), en la que dicho sacárido es preferiblemente glucosa.

El constructo está entre al menos un transportador de hexosa de alta afinidad y uno de baja afinidad de la levadura *Saccharomyces*, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*, que forma dichos transportadores de sacáridos primero y segundo tal como se describió anteriormente. Los transportadores de baja afinidad se seleccionan de HXT1 o HXT3, y los transportadores de alta afinidad se seleccionan de HXT2, 4, 6, 7 o GAL2P, preferiblemente de *Saccharomyces cerevisiae* o secuencias relacionadas con o derivadas de las secuencias de tales moléculas tal como se define en el presente documento. En particular, pueden usarse secuencias análogas y relacionadas de otras especies o géneros, por ejemplo de bacterias, plantas o animales, para producir las quimeras siempre que tengan la identidad de secuencia o propiedades de hibridación requeridas.

Puede generarse una *Saccharomyces cerevisiae* que comprende cualquier combinación de uno o más de los transportadores de hexosa funcionales del grupo HXT1 a HXT17, GAL2, SNF3, RGT2, AGT1, YDL247w e YJR160c. Sin embargo, la invención se refiere a combinaciones de transportadores de alta y baja afinidad tal como se describió anteriormente en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos de tales moléculas son tal como se describen en P32465 (HXT1), P23585 (HXT2), P32466 (HXT3), P32467 (HXT4), P38695 (HXT5), P39003 (HXT6), P39004 (HXT7), S50771 (HXT8), S50708 (HXT9), S48313 (HXT10), S49600 (HXT11), S50356 (HXT12), S50520 (HXT13), S63299 (HXT14), S67809 (HXT15), S57187 (HXT16), S63405 (HXT17), P13181 (GAL2P), A31928 (SNF3), S67684 (RGT2), S64624 (AGT1), S67812 (YDL247w) y S57190 (YJR160c) en las que los números de registro con los prefijos S o A se refieren a los de la base de datos PIR y con el prefijo P se refieren a los de la base de datos Swiss-Prot.

También se incluyen dentro del alcance de la invención quimeras preparadas a partir de una o más secuencias relacionadas con o derivadas de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente (o constructos quiméricos preparados a partir de las secuencias de nucleótidos que codifican para una o más secuencias relacionadas con o derivadas de las secuencias descritas anteriormente) tal como se define en las reivindicaciones, por ejemplo pueden combinarse una (o más) secuencia que se produce de manera natural con una secuencia derivada de una molécula que se produce de manera natural diferente o puede usarse una combinación entre 2 (o más) secuencias cada una relacionada con una molécula diferente.

De manera especialmente preferible, la secuencia de nucleótidos que codifica para una quimera de, o para su uso en, la invención, puede comprender

una o más secuencias o porciones de las mismas (particularmente tal como se describe a continuación en el presente documento) de las secuencias que codifican para uno cualquiera de HXT1, HXT2, HXT3, HXT4, HXT6, HXT7 y GAL2P, preferiblemente de *Saccharomyces cerevisiae*, en secuencias de nucleótidos quiméricas tal como se describió anteriormente,

o una secuencia que se hibrida con dicha secuencia o porción de la misma en condiciones de unión no rigurosas de 6 x SSC/formamida al 50% a temperatura ambiente y lavado en condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo 2 x SSC, 65°C, en la que SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,2,

o una secuencia que presenta una identidad de secuencia de al menos el 95%, por ejemplo al menos el 98% con dicha secuencia o porción de la misma (tal como se determina mediante, por ejemplo búsqueda con FASTA usando paquetes GCG, con valores por defecto y un pamfactor variable, y penalización por creación de huecos fijada a 12,0 y penalización por extensión de huecos fijada a 4,0 con una ventana de 6 nucleótidos),

5 o una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

Tales secuencias o porciones de las mismas pueden comprender una primera o segunda secuencia tal como se describe a continuación en el presente documento.

10 Las "porciones", tal como se hizo referencia anteriormente, comprenden preferiblemente al menos el 30% de la secuencia de tipo natural, por ejemplo al menos el 50, el 70 o el 90% de la secuencia, por ejemplo comprenden 300 o más bases, preferiblemente 500 o más o 600 o más bases. Las porciones tal como se hace referencia en relación con secuencias de aminoácidos comprenden longitudes comparables tal como las codificadas por las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente, por ejemplo 100 o más residuos, preferiblemente más de 180 ó 200 residuos.

15 Observado alternativamente, de manera especialmente preferible las secuencias de nucleótidos que codifican para una quimera de, o para su uso en, la invención, codifican para una secuencia de aminoácidos que puede comprender

20 una o más secuencias o porciones de las mismas (particularmente tal como se describe a continuación en el presente documento) de las secuencias de uno cualquiera de HXT1, HXT2, HXT3, HXT4, HXT6, HXT7 y GAL2P, preferiblemente de *Saccharomyces cerevisiae*, en secuencias de aminoácidos quiméricas tal como se describió anteriormente,

25 o una secuencia que presenta una identidad de secuencia de al menos el 95%, por ejemplo al menos el 98% con dicha secuencia o porción de la misma (tal como se determina mediante, por ejemplo, el uso de la base de datos de secuencias de proteínas SWISS-PROT usando FASTA pep-cmp con un pamfactor variable, y penalización por creación de huecos fijada a 12,0 y penalización por extensión de huecos fijada a 4,0, y una ventana de 2 aminoácidos).

Tales secuencias o porciones de las mismas se codifican por secuencias de nucleótidos que pueden comprender una primera o segunda secuencia tal como se describe a continuación en el presente documento.

30 Preferiblemente, cuando las secuencias de ácido nucleico usadas para preparar las quimeras están relacionadas con o se derivan de las secuencias que se producen de manera natural (y preferiblemente se encuentran dentro de las familias descritas anteriormente), las secuencias relacionadas o derivadas codifican para una proteína funcionalmente equivalente o precursor o porción de la misma.

35 Preferiblemente, por tanto, la invención se extiende a una *Saccharomyces cerevisiae* tal como se definió anteriormente, que comprende la combinación de uno o más genes de transportadores de hexosa funcionales descritos en el presente documento, a las secuencias de ADN que se derivan de estos genes mediante sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos de tal modo que la secuencia de ADN todavía codifica para una proteína que puede transportar hexosa(s), por ejemplo glucosa.

40 La invención también se extiende a constructos quiméricos que codifican para proteínas que son funcionalmente equivalentes a las descritas anteriormente y a continuación, por ejemplo que se forman mediante la combinación de moléculas que se producen de manera natural (o secuencias relacionadas con o derivadas de las mismas, por ejemplo equivalentes funcionales), en la que esa combinación puede modificarse adicionalmente, por ejemplo mediante sustitución, delección o adición, para proporcionar una secuencia que codifica para una proteína funcionalmente equivalente o precursor o porción de la misma tal como se define a continuación en el presente documento, en la que preferiblemente dicha proteína funcionalmente equivalente cumple la identidad definida anteriormente, por ejemplo tiene una identidad de al menos el 98% con la secuencia formada mediante la combinación, o en la que la secuencia codificante cumple las condiciones de hibridación o identidad descritas anteriormente.

50 Por tanto, en una característica adicional la invención proporciona una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante modificada tal como se describe en el presente documento que expresa un gen modificado (es decir, un constructo quimérico tal como se describe en el presente documento) que se deriva de los genes de los transportadores de sacáridos de baja y alta afinidad descritos en el presente documento, o transformantes derivados (por ejemplo moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes) que se encuentran dentro de la definición descrita anteriormente en el presente documento.

55 Por tanto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos quimérica tal como se describe en el presente documento o una molécula de ácido nucleico funcionalmente equivalente para la misma, que cumple las condiciones de hibridación y/o identidad descritas anteriormente o una secuencia complementaria de la misma, y células de levadura modificadas que contienen la misma.

Tal como se describió anteriormente, las quimeras se preparan entre los transportadores de baja afinidad HXT1 o HXT3 y los transportadores de alta afinidad HXT2, 4, 6, 7 (de manera especialmente preferible HXT6 o 7) o GAL2P.

5 De manera particularmente preferible, los constructos quiméricos se preparan entre HXT1 y HXT7 o secuencias relacionadas con o derivadas de los mismos, y se usan para transformar levaduras para proporcionar la levadura de la invención. Preferiblemente, se conjugan porciones N-terminales de HXT1 con porciones C-terminales de HXT7. La forma alternativa con HXT7 en el extremo N-terminal y HXT1 en el extremo C-terminal también se describe pero no se incluye dentro del alcance de la invención.

10 Por tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica para la quimera (es decir, el constructo quimérico) descrita en el presente documento comprende una secuencia que tiene la forma:

A – B

en la que

A es un primer componente (es decir, la primera secuencia tal como se describió anteriormente en el presente documento) que comprende las bases de nucleótidos w a x;

15 B es un segundo componente (es decir, la segunda secuencia tal como se describió anteriormente en el presente documento) que comprende las bases de nucleótidos (x+y) a z;

en la que A y B se derivan de moléculas distintas, por ejemplo HXT1 y HXT7, es decir, de las secuencias de nucleótidos de diferentes transportadores de sacáridos o de secuencias relacionadas con o derivadas de las mismas tal como se definió anteriormente en el presente documento;

20 w es una primera posición dentro de la secuencia de nucleótidos de la que se deriva dicho primer componente (por ejemplo HXT1 o una secuencia comparable tal como se describió anteriormente), que es menor que x, es de 1 a 50, de manera especialmente preferible de 1 a 10, por ejemplo 1;

25 x es una segunda posición dentro de la secuencia de nucleótidos de la que se deriva dicho primer componente y es mayor que w y es un número desde 400 hasta 900, por ejemplo de 500 a 850 (un número de 300 a 1250 también se da a conocer pero no es según la invención);

y es un número entero, menor de 3, por ejemplo 1;

x+y es una primera posición dentro de la secuencia de nucleótidos de la que se deriva dicho segundo componente (por ejemplo HXT7 o una secuencia comparable tal como se describió anteriormente);

30 y z es una segunda posición dentro de la secuencia de nucleótidos de la que se deriva dicho segundo componente y es mayor que x+y, desde 1600 hasta 1713, por ejemplo de 1675 a 1713;

en la que dichos valores se refieren a la posición dentro de la secuencia de nucleótidos de dicho transportador de sacáridos, por ejemplo HXT1 o HXT7 o una secuencia comparable de la misma.

35 Las moléculas transportadoras de *Saccharomyces cerevisiae* comprenden 12 secuencias transmembrana. En una característica preferida, el punto de unión entre las 2 o más porciones que forman juntas la quimera se encuentra dentro de la secuencia de los tramos transmembrana 3º a 9º. Por tanto, preferiblemente x es una posición en la secuencia abarcada por los tramos transmembrana tercero a noveno de HXT1 o HXT7 o una secuencia comparable, de manera especialmente preferible de 525 a 800, por ejemplo 525-575 y/o 720-770, de manera especialmente preferible de 545 a 560 y/o de 735 a 750 e y es preferiblemente 1 y z es preferiblemente tal como se describió anteriormente.

40 Preferiblemente, las quimeras de la invención tienen un total de 12 dominios transmembrana (por ejemplo w es menor de 10 y x es de desde 1675 hasta 1713). Esto puede lograrse por ejemplo combinando algunos de los 12 dominios transmembrana (por ejemplo los dominios 1 a 3-9, o partir de los mismos) de un primer transportador y el resto (de 3-9 a 12, o partes de los mismos) de un segundo transportador. Sin embargo, también se contemplan más o menos dominios transmembrana y pueden aparecer opcionalmente grupos ligadores entre uno o más de los dominios transmembrana. Por tanto, preferiblemente dichas quimeras de la invención comprenden desde 6 hasta 18 dominios transmembrana, por ejemplo de 10 a 14, que se derivan de 2 o más moléculas transportadoras tal como se describió anteriormente en el presente documento.

50 Dichas quimeras descritas anteriormente pueden contener más de 2 componentes, por ejemplo múltiples porciones, por ejemplo 2 o más secuencias de la secuencia de nucleótidos de una o más moléculas transportadoras o secuencias a partir de las secuencias de nucleótidos de más de 2 transportadores tal como se describe en el presente documento, en cuyo caso las porciones se proporcionan en paralelo, preferiblemente para conservar la estructura transmembrana, por ejemplo la estructura transmembrana 10-14, preferiblemente 12, opcionalmente con uno o más grupos ligadores entre dichas porciones siempre que dichas quimeras tengan las secuencias tal

como se describieron anteriormente en el presente documento. También puede insertarse un grupo ligador entre A y B anteriores (es decir, y puede ser mayor de 1), siempre que esto no afecte a la funcionalidad de la quimera.

De manera especialmente preferible, x es 551 ó 741, w e y = 1 y Z = 1713. Alternativamente, x puede ser 668. Se exponen polipéptidos quiméricos codificados por tales moléculas de ácido nucleico en las secuencias 1 y 2 (SEQ. ID No. 17 y 18 en la lista de secuencias). Tales secuencias, secuencias que las comprenden, polipéptidos funcionalmente equivalentes (que cumplen los requisitos de identidad descritos anteriormente) y moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica para los mismos, forman aspectos preferidos de la invención. En una característica preferida, dichas secuencias de ácido nucleico codificantes son tal como se expone en las secuencias 3 y 4 (SEQ ID No. 19 ó 20 en la lista de secuencias). Células de levadura que expresan estas formas también forman aspectos preferidos de la invención. En particular, un aspecto adicional de la invención proporciona una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante modificada tal como se describió anteriormente denominada *Saccharomyces cerevisiae* KOY.TM4P o KOY.TM6P o transformantes derivados de la misma que se encuentran dentro de las definiciones anteriores, que tienen particularmente el número de depósito DSM 13832 o DSM 13555, respectivamente.

Moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos tal como se describió anteriormente, secuencias que codifican para proteínas quiméricas tal como se describió anteriormente y secuencias complementarias a las mismas forman aspectos adicionales de la invención. Proteínas o polipéptidos que comprenden una secuencia codificada por tales moléculas de ácido nucleico forman aspectos adicionales de la invención. Además, la invención se extiende a proteínas funcionalmente equivalentes tal como se describió anteriormente en el presente documento, además de aquéllas en las que los aminoácidos se han modificado químicamente, incluyendo mediante desglucosilación o glucosilación. En particular, estas proteínas variantes pueden prepararse mediante modificación tras la síntesis/aislamiento del sustrato sin afectar a la funcionalidad, por ejemplo cierta glucosilación, metilación, etc. de residuos particulares. Pueden usarse aminoácidos no convencionales, tales como ácido α -aminobutírico, penicilamina, ácido piroglutámico o análogos restringidos de manera conformacional, por ejemplo tales como Tic (para reemplazar a Phe), Aib (para reemplazar a Ala) o ácido pipercolico (para reemplazar a Pro).

Por tanto, en un aspecto preferido la presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia codificada por la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos quimérica de la invención o una secuencia complementaria a la misma en la que el polipéptido comprende un transportador de sacáridos quimérico funcional. Otra realización se refiere a un vector o una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente.

Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden ser ADN, ADNc o ARN mono o bicatenario, preferiblemente ADN e incluyen secuencias degeneradas, sustancialmente idénticas e hibridantes tal como se describió anteriormente. Idealmente, sin embargo, se emplea ADN genómico o ADNc.

Tales moléculas exógenas pueden introducirse en células de levadura por cualquier medio apropiado. Se describen bien en la bibliografía técnicas de transformación o transfección adecuadas. Las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente pueden unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión, o un vector o vehículo de clonación de ADN recombinante que contiene una molécula de ADN recombinante de este tipo. En particular, pueden introducirse moléculas de ácido nucleico apropiadas en vectores para su expresión apropiada en la célula. Alternativamente, la molécula de ADN desnudo puede introducirse directamente en la célula. Convenientemente, la transformación de células de levadura tal como se describe en el presente documento se efectúa mediante el método de transformación de acetato de litio (Burke *et al.*, 2000, CSHL Press, págs. 103-105) o mediante métodos de esferoplastos o congelación-descongelación u otras técnicas apropiadas (véase por ejemplo Dohmen *et al.*, 1991, Yeast, 7, págs. 691-692).

Los vectores de expresión apropiados incluyen secuencias de control apropiadas tales como por ejemplo elementos de control de la traducción (por ejemplo codones de iniciación y terminación, sitios de unión ribosómicos) y de la transcripción (por ejemplo regiones promotoras-operadoras, secuencias de parada de terminación) unidos en marco de lectura coincidente con las moléculas de ácido nucleico de la invención. Los vectores apropiados pueden incluir plásmidos y virus (incluyendo tanto bacteriófagos como virus eucariotas). Los vectores virales adecuados incluyen baculovirus y también adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes y vaccinia/de la viuela. Se describen en la técnica muchos otros vectores virales.

Se conocen una variedad de técnicas y pueden usarse para introducir los vectores en células para su expresión. Tales vectores y células eucariotas o procariontas, particularmente células de levadura, en las que se han transformado dichos vectores, forman aspectos adicionales de la invención.

Tal como se mencionó anteriormente, pueden introducirse moléculas de ácido nucleico de la invención, o vectores que las comprenden, en células de levadura *Saccharomyces*, de manera especialmente preferible *Saccharomyces cerevisiae*. Tales células pueden corresponder a células de tipo natural. Sin embargo, convenientemente, dichas células pueden modificarse (por ejemplo representar una forma recombinante alterada) incluso antes de la inclusión del material de ácido nucleico relacionado con las moléculas quiméricas.

Por tanto, en una realización preferida, el fenotipo de la célula de tipo natural se modifica para producir una cepa nula en cuanto a moléculas de transporte de sacáridos, particularmente glucosa, es decir, para proporcionar una cepa nula sin o con propiedades de transporte de sacáridos gravemente limitadas, que presenta por ejemplo una captación de glucosa preferiblemente inferior a 2 nmol de glucosa/min./mg de biomasa. Esto puede lograrse mediante la modificación del genotipo para eliminar o alterar los genes que codifican para uno o más de HXT1-17, Gal2, Stt1 y 3 transportadores de maltosa con propiedades de transporte y afinidad de glucosa, concretamente AGT1, YDL247w/MPH2 e YJR160c/MPH3 o alterando la expresión de uno o más de los genes (por ejemplo delecionando uno o más factores de transcripción o traducción necesarios) o alterando la función de uno o más de los transportadores expresados. Convenientemente, todos los genes descritos anteriormente, sistemas de control que afectan a estos genes o proteínas expresadas pueden alterarse o dañarse de manera que no estén disponibles transportadores activos para el transporte. Sin embargo, alternativamente, puede afectarse a un subconjunto de transportadores o a sus genes o a la expresión de los mismos, preferiblemente al menos HXT1-4, 6, 7 y GAL2. Estos efectos pueden lograrse tal como se describió anteriormente alterando por ejemplo los genes de los transportadores, afectando a la transcripción o traducción de los genes o mediante metodologías de mutación negativa dominante. La molécula de ácido nucleico que codifica para la quimera tal como se describe en el presente documento puede introducirse después de eso en la cepa nula para proporcionar un fenotipo de transporte de sacáridos.

Constructos y particularmente cepas de *Saccharomyces* modificadas que tienen las propiedades descritas anteriormente tienen gran potencial como herramientas para procedimientos preparativos en los que pueden manipularse rutas metabólicas y evitarse productos secundarios no deseados. Se ha buscado durante mucho tiempo una cepa de levadura que no produzca nada de etanol. Las cepas novedosas servirán por tanto como herramientas inestimables en futuros esfuerzos de caracterización, por ejemplo para encontrar una explicación para el mecanismo de represión durante el crecimiento aerobio sobre glucosa en *S. cerevisiae*. Además, una cepa que no produzca nada de etanol incluso cuando se hace crecer sobre altas concentraciones de azúcar durante cultivo discontinuo aerobio es también de considerable interés en cuanto a su explotación para uso industrial.

Por tanto, pueden usarse células de *Saccharomyces* de la invención en cualquier procedimiento en el que no se desee la producción de alcohol y otros productos producidos durante la fermentación. Tales procedimientos incluyen por ejemplo la producción de metabolitos de alto o bajo peso molecular no alcohólicos, o compuestos de bajo o alto peso molecular tales como productos químicos finos y a granel, productos alimenticios, un alimento funcional, agentes terapéuticos y bebidas bajas en alcohol o no alcohólicas.

Estos productos pueden producirse mediante la levadura no modificada de la invención, por ejemplo pueden producirse bebidas bajas en alcohol o no alcohólicas usando fuentes de carbono que contienen sacáridos apropiados, por ejemplo zumos de frutas. De este modo, pueden generarse vinos, cervezas u otras bebidas bajas en alcohol o no alcohólicas. Las bebidas no alcohólicas tienen preferiblemente los niveles de alcohol definidos en el presente documento. Sin embargo, en una característica preferida, se produce una cerveza con niveles de alcohol de menos del 1% p/v de alcohol, de manera especialmente preferible <0,5%, y de manera similar puede producirse vino con niveles de alcohol de menos del 10%, de manera especialmente preferible menos del 2,5 o el 1% p/v de alcohol.

Alternativamente, tales productos pueden producirse mediante la introducción de material genético exógeno que codifica para un producto de interés. Alternativamente, puede usarse material genético exógeno que influye en la actividad metabólica de la célula, dando como resultado por tanto la producción de, o el aumento de producción de, un producto de la células de levadura, desviando los procesos metabólicos de la células para producir (o aumentar la producción de) un producto deseado. En una alternativa adicional, puede modificarse material genético endógeno para influir en la actividad metabólica de la célula y por tanto favorecer la producción de un producto deseado.

Los productos de la modificación mediante ingeniería genética descrita anteriormente pueden producirse de manera natural en dichas células de levadura antes de la modificación mediante ingeniería genética, pero se hace que presenten una producción mejorada tras dicha modificación mediante ingeniería genética. En tales casos, el material exógeno puede codificar por ejemplo para una proteína implicada en el proceso metabólico (o bien directa o bien indirectamente), o un inhibidor de un proceso catabólico, o puede proporcionar control regulatorio de la expresión de tales proteínas, por ejemplo un promotor inducible o constitutivo.

La modificación del material genético endógeno puede realizarse para afectar a procesos metabólicos, por ejemplo puede modificarse una secuencia que codifica para una proteína o un inhibidor o una secuencia que proporciona control regulatorio para de ese modo efectuar las funciones de ese componente.

Sin embargo, los productos de la modificación mediante ingeniería genética metabólica pueden no producirse en la levadura de tipo natural, y en cuyo caso dicha modificación mediante ingeniería genética puede dar como resultado la expresión de uno o más polipéptidos que son el producto, o que hacen posible la producción del producto deseado.

5 Sin embargo, en un aspecto preferido, el producto es una entidad que puede producirse por dicha célula de levadura (antes de la inclusión de constructos de la invención) pero que se produce en cantidades aumentadas tras la introducción del material genético exógeno, o la modificación del material genético endógeno, tal como se describió anteriormente. Por tanto, en una característica preferida, productos que pueden producirse por la levadura de la invención son aminoácidos, péptidos, polipéptidos, azúcares, polioles pequeños y dióxido de carbono, por mencionar sólo unos cuantos.

10 Por tanto, puede insertarse en, o modificarse en, células de levadura de la invención, material genético exógeno o endógeno, que codifica para un producto de interés o parte del mismo, o un polipéptido que facilita directa o indirectamente la producción de un producto de interés, o material genético exógeno o endógeno que influye en la expresión del mismo, por ejemplo opcionalmente mediante transformación estable en el genoma de las células en el caso de material genético exógeno. Las células pueden hacerse crecer entonces bajo altas concentraciones de sacáridos en condiciones aerobias y recogerse el producto así formado.

15 Por tanto, en un aspecto aún adicional la presente invención proporciona un método de inserción de material exógeno en una célula de levadura tal como se describió anteriormente, para producir una célula de levadura de la invención que contiene material genético exógeno, comprendiendo dicho método al menos las etapas de introducir dicho material genético, preferiblemente contenido dentro de un vector, en dicha célula, por ejemplo mediante transformación. Preferiblemente, el material exógeno codifica para, o controla la expresión de, un producto que es, o que permite la producción de, un producto. Establecido alternativamente, el material exógeno codifica para dicho producto o parte del mismo o codifica para un polipéptido (o parte del mismo) que facilita la producción directa o indirecta de dicho producto o parte del mismo, o afecta a la expresión de dicho producto o polipéptido. Un producto de este tipo puede ser un metabolito de alto o bajo peso molecular, o un compuesto de bajo o alto peso molecular tal como un producto químico fino o a granel, un producto alimenticio, un alimento funcional o un agente terapéutico, por ejemplo tal como se describió anteriormente. Células obtenibles mediante este método forman aspectos adicionales de la invención.

25 Estas levaduras modificadas adicionalmente pueden usarse entonces para producir el producto deseado que puede aislarse entonces de las células de levadura. Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una *Saccharomyces cerevisiae* que tiene propiedades de transporte de hexosa modificadas y que no produce etanol en condiciones aerobias y altas concentraciones de hexosa, en la preparación y fabricación de sustancias incluyendo metabolitos de bajo o alto peso molecular, preferiblemente en la preparación y fabricación de productos químicos finos y a granel, productos alimenticios, un alimento funcional, agentes terapéuticos o bebidas no alcohólicas.

35 Observado alternativamente, la invención proporciona además un método de preparación de un producto, por ejemplo un polipéptido, aminoácido, azúcar o poliol en una levadura de la invención que contiene el material genético tal como se describió anteriormente, comprendiendo dicho método hacer crecer dichas células de levadura en condiciones aerobias en presencia de altas concentraciones de sacáridos, preferiblemente glucosa. En una característica preferida alternativa, tal como se mencionó anteriormente, se producen productos por levaduras de la invención que no se han modificado adicionalmente, pero que producen bajos niveles de alcohol y por tanto cuando se hacen crecer en un medio apropiado producen productos de interés, por ejemplo bebidas bajas en alcohol o no alcohólicas. Pueden aislarse los productos así producidos tal como se describió anteriormente.

40 En la determinación del crecimiento, la producción de alcohol, el consumo de sacáridos u otros parámetros descritos en el presente documento se usan las siguientes condiciones de prueba. Estos parámetros se evalúan durante el periodo de crecimiento exponencial en condiciones aerobias (O₂ no limitante) a 30°C, en el medio usado por Verduyn *et al.* (1992, *Yeast*, 8, págs. 501-517) a pH 5,00 en presencia de glucosa al 2%, con un cultivo de partida de 0,3 a 0,7 g de biomasa seca/l (preferiblemente 0,3) en fermentadores de 1,5 l, con agitación a 1500 rpm y un flujo de entrada de aire de 0,5 volúmenes de aire por volumen de recipiente por minuto (vvm).

45 El contenido en biomasa (peso seco) se determina tal como sigue: se retiran 5 ml del cultivo y se centrifugan durante 5 minutos en tubos de peso seco pesados previamente a suficientes rpm como para sedimentar sustancialmente todas las células. Se lava el sedimento una vez con 5 ml de NaCl al 0,9% y se vuelve a sedimentar. Se seca el sedimento durante 24 horas a 110°C antes del equilibrado de la temperatura y el pesaje.

50 Se efectúa el análisis de gas continuo usando un monitor de oxígeno y dióxido de carbono de tipo 1308, Briel y Kjaer, Naerum, Dinamarca, por ejemplo para calcular las tasas de consumo de oxígeno.

55 Se realizan las determinaciones de glucosa y etanol en las muestras tal como sigue: se centrifugan muestras de 1,5 ml del cultivo a 15000 g durante 1 minuto y se congelan los sobrenadantes resultantes a -20°C hasta su análisis. Se determinan las concentraciones usando kits de combinación enzimáticos de Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania.

Tal como se usa en el presente documento, una levadura "modificada" se refiere a una que se ha derivado de o está relacionada con una levadura de tipo natural pero que presenta variación fenotípica y preferiblemente también genotípica con respecto a la misma. Preferiblemente, el genotipo se ha modificado, particularmente en rela-

ción con genes que codifican para moléculas de transporte de sacáridos, lo que da como resultado un fenotipo alterado. Convenientemente, esto puede lograrse mediante recombinación para eliminar y/o modificar la información genética existente y/o alterar y/o integrar secuencias genéticas exógenas. Preferiblemente, la modificación se refiere a al menos la inclusión de moléculas de ácido nucleico quiméricas tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, también pueden contemplarse modificaciones adicionales, preferiblemente las que afectan adicionalmente a las moléculas de transporte de sacáridos, por ejemplo mediante la creación de células de levadura que no pueden transportar glucosa o presentan una capacidad gravemente restringida para hacerlo, antes de la inserción de la quimera. Estos organismos recombinantes forman características preferidas de la invención. Además, pueden contemplarse modificaciones genéticas adicionales, por ejemplo para introducir material genético que codifica para un producto deseable o parte del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, "tipo natural" se refiere a la cepa de levadura de la que se deriva originalmente la levadura modificada o con la que está relacionada. Cuando se hace referencia al % de alcohol, crecimiento, etc. de la levadura de la invención en relación con el tipo natural, dicho tipo natural se refiere a la levadura no modificada, que se produce de manera natural, antes de la inserción de los constructos de la invención o la modificación del genoma de cualquier modo, es decir, no se refiere por ejemplo a una cepa nula en la que se inserta el constructo, sino que en su lugar se refiere a la cepa que se produce de manera natural a partir de la que se genera la cepa nula. Por tanto, cuando la invención se refiere a levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada, el tipo natural es la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que se ha modificado. Secuencias de tipo natural se refiere a las que se producen en microorganismos de tipo natural tales como los definidos anteriormente en el presente documento.

"*Saccharomyces*" se refiere al género de la levadura de tipo natural que se modifica. "*Saccharomyces cerevisiae*" se refiere a la especie particular que se modifica preferiblemente, e incluye todas las cepas que se encuentran dentro de esa especie particular.

Tal como se usa en el presente documento, "alcohol" se refiere a la producción de alcoholes tales como glicerol y etanol. Sin embargo, en las pruebas descritas en el presente documento, se somete a prueba el nivel de etanol. El glicerol contribuye sólo a una pequeña proporción del contenido en alcohol total en relación con el etanol. "Que no produce etanol" se refiere a una levadura que produce las cantidades de etanol descritas anteriormente, por ejemplo inferiores o iguales a 0,12 g/l, en las condiciones de ensayo.

Los niveles en g/l de alcohol, en particular etanol, se refieren a la cantidad producida por litro de cultivo en las condiciones de prueba cuando se evalúa de manera continua a puntos de tiempo diferenciados. Se logran generalmente niveles máximos justo antes del agotamiento de la glucosa durante cultivo discontinuo.

"Condiciones aerobias" se refiere a condiciones de cultivo que no son limitantes para el oxígeno y por tanto permiten el uso de rutas respiratorias. "Crecimiento aerobio" se refiere a crecimiento, por ejemplo tal como se mide aumentando la densidad óptica a 610 nm y el aumento en el contenido en biomasa en tales condiciones.

Un "transportador" se refiere a una molécula responsable de la transferencia de la molécula que va a transportarse desde el medio de cultivo extracelular al interior de la célula o viceversa, es decir, que efectúa su paso, por ejemplo difusión, a través de la membrana plasmática. Pueden producirse quimeras usando receptores de sacáridos tales como SNF3 y RGT2 y secuencias relacionadas con o derivadas de los mismos pero no se encuentran dentro del alcance de la definición de transportadores en tanto que se refiere a transportadores que pueden usarse para preparar quimeras de la invención.

Propiedades de transporte de "hexosa" o "sacárido" se refiere a la capacidad de la levadura modificada de la invención para captar sacárido del medio de cultivo extracelular.

Un "transportador de hexosa funcional" se refiere a una molécula transportadora que puede ser una molécula que se produce de manera natural o una variante funcionalmente equivalente tal como se describe en el presente documento que puede transportar un sacárido tal como se describió anteriormente. En referencia a transportadores de hexosa funcionales que pueden usarse para preparar quimeras de la invención, en línea con la definición de transportadores, tales transportadores de hexosa funcionales también se extienden a moléculas que tienen la función de receptores de sacáridos.

Por "gen de transportador de hexosa" quiere decirse un gen que codifica para una proteína que efectúa el paso, por ejemplo difusión, de hexosas a través de la membrana plasmática, por ejemplo los genes HXT4, HXT5 o HXT6.

"Sacárido" se refiere a mono, di o polisacáridos que pueden usarse como fuente de carbono por la levadura *Saccharomyces* modificada o de tipo natural de la invención. Preferiblemente, los sacáridos son monosacáridos, de manera particularmente preferible glucosa, fructosa, manosa o galactosa, o disacáridos tales como maltosa. Preferiblemente, tales sacáridos están en la forma D que se produce de manera natural. Para su uso en condiciones de prueba, se emplean sacáridos en forma D no derivatizados que se producen de manera natural, tales como D-glucosa. "Hexosa" se refiere a monosacáridos tales como los mencionados anteriormente, por ejemplo glucosa, fructosa y galactosa.

La “tasa de crecimiento” tal como se hace referencia en el presente documento está relacionada matemáticamente con el tiempo de generación y tiene la relación: $\mu = \ln(2)/G$; en la que μ es la tasa de crecimiento específica, y G es el tiempo de generación. Como tales, valores para la tasa de tiempo de generación en % en relación con la levadura de tipo natural proporcionan de manera similar tasas de de crecimiento en % preferidas.

- 5 El “tiempo de generación” se mide en horas y se refiere al tiempo de duplicación, es decir, el tiempo que tarda cada generación en producirse durante el cultivo, en el que las generaciones se evalúan mediante referencia a los aumentos en el peso seco de la biomasa. Se han realizado otros experimentos que determinan el tiempo de generación mediante referencia a las lecturas a DO₆₁₀. En tales casos, TM6 produce un valor de 2,9 y TM4 un valor de 2,5. Sin embargo, las definiciones proporcionadas en el texto se refieren a los valores determinados usando la medición del peso seco descrita anteriormente.

10 La “tasa de consumo de glucosa” se refiere a la cantidad de glucosa consumida del medio externo durante las condiciones de prueba, y se evalúa por tanto mediante la medición de la glucosa en el medio en al menos 2 puntos de tiempo y el cálculo de la glucosa consumida en el tiempo entre esos puntos de tiempo. Este valor se proporciona en mmol de glucosa/(g de biomasa.h), en el que g de biomasa se refiere a la masa seca de levadura en el cultivo.

15 “Biomasa” se refiere a la masa atribuida a la masa seca de la levadura en el cultivo.

El término concentraciones de “hexosa altas” usado en el contexto de hacer crecer *Saccharomyces cerevisiae* se refiere a cualquier concentración de hexosa que supere 1 mM, preferiblemente que supere 5 mM presente en el medio, de manera especialmente preferible mayor de 50 mM, por ejemplo igual a o mayor de hexosa, preferiblemente glucosa, al 1 o al 2%. Sin embargo, en las condiciones de prueba, se usa un valor de glucosa al 2%, es decir, 111 mM. Se aplican definiciones similares a altas concentraciones de sacárido o glucosa. Pueden producirse productos descritos en el presente documento a diversos altos niveles de sacárido, por ejemplo mayores de (o iguales a) sacárido al 1, el 2, el 5, el 10 o el 20%. En particular, pueden usarse los niveles de sacárido superiores cuando se producen las bebidas descritas en el presente documento.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, “crecimiento exponencial” se refiere a una tasa exponencial de duplicación de la biomasa.

Tal como se usa en el presente documento, una “quimera” se refiere a una molécula de ácido nucleico o polipéptido compuesto por dos o más secuencias (secuencias componentes) derivadas de dos o más moléculas diferentes, preferiblemente dos secuencias cada una derivada de una molécula diferente. Por tanto, tales quimeras proporcionan el resultado de una combinación de tales secuencias. Tal como se describió anteriormente en el presente documento, dichas secuencias componentes (o las secuencias originales de las que son una porción) pueden producirse de manera natural o pueden estar relacionadas con o derivarse de tales secuencias que se producen de manera natural. Aunque convenientemente las secuencias componentes separadas pueden combinarse entre sí uniendo las respectivas secuencias una con otra, alternativamente, en particular si las secuencias son altamente homólogas, pueden usarse técnicas alternativas para obtener la quimera, por ejemplo mediante mutación de sitios apropiados dentro de una molécula particular para llegar a una secuencia que en efecto refleja una quimera entre dos secuencias distintas.

30 Un “constructo quimérico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica para o que proporciona una quimera tal como se definió anteriormente, que comprende adicionalmente de manera opcional secuencias flanqueantes que contienen opcionalmente elementos funcionales, por ejemplo secuencias promotoras.

35 “Transformado de manera estable” se refiere a la inclusión (preferiblemente inserción en el genoma) del constructo de la invención en células de levadura tal como se describe en el presente documento, de manera que la región codificante de dicho constructo puede expresarse, y el constructo o parte del mismo que codifica para una quimera de la invención está presente en la progenie de la célula de levadura.

Tal como se usa en el presente documento, transportadores de “baja afinidad” se refiere a los que se unen a la glucosa con una K_m de más de 20 mM, por ejemplo de 50-100 mM en las condiciones descritas en el presente documento en el ejemplo 1. Transportadores de “alta afinidad” se refiere a los que tienen una K_m de menos de 20 mM, preferiblemente menos de 10 mM, por ejemplo 1-2 mM.

40 Secuencias que están “relacionadas con o se derivan” de secuencias de aminoácidos o nucleótidos descritas en el presente documento se refiere a secuencias que se han modificado en relación con esas secuencias, por ejemplo mediante sustitución, delección o adición. Preferiblemente, tales secuencias son equivalentes funcionales tal como se describe en el presente documento. Las secuencias tienen las propiedades de hibridación o identidad establecidas tal como se describió anteriormente en el presente documento.

45 Proteínas “funcionalmente equivalentes” tal como se usa en el presente documento se refiere a proteínas relacionadas con o derivadas de la proteína nativa o que se produce de manera natural, en las que la secuencia de aminoácidos se ha modificado mediante sustitución, adición y/o delección de aminoácidos individuales o múltiples,

5 pero que no obstante conservan la misma función, es decir, pueden transportar (o cuando se usan para preparar quimeras actuar como receptor para) una o más moléculas de sacárido, por ejemplo glucosa, en un grado menor o mayor que las moléculas que se producen de manera natural. Tales proteínas están codificadas por “moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes” que se generan mediante sustitución, adición y/o delección apropiada de una o más bases. La molécula de ácido nucleico o proteína funcionalmente equivalente cumple las condiciones de hibridación y/o identidad expuestas anteriormente en el presente documento.

Dentro del significado de variantes de “adición” se incluyen polipéptidos o proteínas de fusión amino y/o carboxilo terminales, que comprenden un polipéptido o proteína adicional fusionado a la parte quimérica.

10 Tales variantes funcionalmente equivalentes mencionadas anteriormente incluyen variantes biológicas naturales (por ejemplo variantes alélicas o variaciones geográficas dentro de una especie o alternativamente en géneros diferentes, por ejemplo plantas, animales o bacterias) y derivados preparados usando técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas funcionalmente equivalentes mediante síntesis química o en forma recombinante usando las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio incluyendo delección, mutagénesis al azar o escisión enzimática y/o ligamiento de ácidos nucleicos. En particular, las moléculas de ácido nucleico que codifican para variantes de proteínas funcionalmente equivalentes para la producción de quimeras según la invención se extienden a análogos en géneros o especies diferentes que las moléculas específicas mencionadas en el presente documento.

20 Los “precursores” de las proteínas que se producen de manera natural pueden ser proteínas más grandes que se procesarían, por ejemplo, mediante proteólisis para producir el sustrato. Tales precursores pueden tomar la forma de zimógenos, es decir, precursores inactivos de enzimas, activados mediante escisión proteolítica.

25 Las “porciones” de proteínas funcionalmente equivalentes son tal como se describió anteriormente, y por sí mismas no presentan necesariamente la actividad de la molécula original. Estas porciones cumplen las condiciones de identidad (en relación con una región comparable) o hibridación mencionadas en el presente documento. Porciones de productos se refiere a porciones que cuando se combinan con otras entidades forman el producto deseado.

“Un polipéptido o parte del mismo que facilita la producción directa o indirecta de un producto o parte del mismo” se refiere a una molécula, o una parte de una molécula o complejo, que al expresarse en una célula de levadura de la invención da como resultado la producción del producto o parte del mismo, por ejemplo alterando o contribuyendo a rutas que afectan a su producción.

30 Un polipéptido “afecta a la expresión” de un producto o polipéptido cuando ejerce un control regulatorio sobre dicha expresión.

Los siguientes ejemplos se facilitan sólo a modo de ilustración en los que las figuras a las que se hace referencia son tal como sigue:

35 la figura 1 muestra el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono en diferentes fases del ciclo de crecimiento de *S. cerevisiae* de la cepa de tipo natural KOY.PK2-1C83 prototrópica;

la figura 2 muestra el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono en diferentes fases del ciclo de crecimiento de *S. cerevisiae* de la cepa que expresa TM6 prototrópica;

la figura 3 muestra un gráfico semilogarítmico de la densidad óptica frente al tiempo que proporciona la medida del crecimiento de la biomasa durante el crecimiento aerobio sobre glucosa por la cepa que expresa TM6;

40 la figura 4 muestra un gráfico en línea continuo de la razón entre la tasa de producción de dióxido de carbono y el consumo de oxígeno que da como resultado la monitorización continua del CR durante el ciclo aerobio sobre glucosa de la cepa que expresa TM6. No deben considerarse las mediciones durante las primeras 20 h debido a la sensibilidad limitante;

la figura 5 muestra la medición de la producción de calor en línea para KOY.TM4P;

45 la figura 6 muestra un gráfico semilogarítmico de la densidad óptica frente al tiempo que proporciona la medida del crecimiento de la biomasa sobre glucosa por la cepa que expresa TM4; y

la figura 7 muestra un gráfico semilogarítmico de la biomasa (g/l)/tiempo (h) para A) TM6 y B) TM4.

Ejemplo 1: Producción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas que contienen quimeras de HXT1 y HXT7

50 La levadura de la familia HXT tiene claras similitudes con la Glut1 de mamíferos. Puesto que esta proteína tiene 12 dominios transmembrana con extremos N y C-terminales ubicados en el citoplasma (Mueckler, 1994, Eur. J. Biochem., 291, págs. 713-725), es muy probable que los transportadores de hexosa de levaduras tengan una topología similar en la que los extremos N y C terminales estén ubicados intracelularmente y la se-

cuencia que une los extremos terminales pasa hacia atrás y hacia adelante a través de la membrana para proporcionar 12 regiones transmembrana unidas entre sí por bucles intracelulares o extracelulares de diversas longitudes. Se produjeron quimeras que contenían HXT1 en el extremo N-terminal fusionadas entre sí con HXT7 en la región transmembrana. Por ejemplo, KOY.TM6P (presente innovación) que se fusiona en la región transmembrana 6 es idéntica a HXT1 del extremo N-terminal hasta la mitad de la región transmembrana 6 mientras que el resto de la proteína es equivalente a HXT7.

Esto da en total 12 constructos denominados TM1 a TM12 que se han integrado todos en el genoma.

Materiales y métodos

Cepas

Se ha mostrado que una cepa CEN.PK con deleciones para los genes de los transportadores de azúcar *HXT1-7* todavía crece sobre glucosa (Wieczorke *et al.*, 1999, FEBS Lett., 464, págs. 123-128). Debido a esto, se han delecionado los genes *HXT* adicionales (en total 17 genes), así como genes adicionales (véase a continuación) con el fin de obtener una cepa *nula* verdadera en cuanto a transporte de glucosa (Wieczorke *et al.*, 1999, citado anteriormente), EBY.VW4000. Aunque los papeles fisiológicos de *HXT8-17* no se han descrito hasta la fecha (excepto que se ha descrito que *HXT9* y *11* están implicados en resistencia a múltiples fármacos), desde luego no son silenciosos durante todas las condiciones. Un mutante por deleción de *hxt5* no muestra un fenotipo claro en medios con glucosa. Se expresa en células privadas de glucosa, probablemente con el fin de garantizar una rápida utilización del azúcar cuanto está disponible. La cepa *nula* completa es útil, puesto que la reintroducción de uno o varios transportadores de hexosa específicos de levaduras o incluso de otros organismos puede usarse para estudiar la cinética de captación y la cinética de consumo de azúcar de transportadores específicos. Por tanto, la cepa *nula* es en primer lugar una herramienta para estudiar las propiedades de los transportadores de hexosa heterólogos o de levaduras específicos.

La cepa de tipo natural CEN.PK2-1C tiene los siguientes marcadores genéticos *Mata leu2-52*, *112ura3-52*, *trp1-289*, *his3-Δ1*, *MAL2-8c SUC2*. Esta cepa se hizo prototrófica (KOY.PK2-1C83) introduciendo los genes marcadores uno a uno mediante transformación. El "mutante nulo" EBY.VW4003 (*Mata leu2-52*, *112ura3-52*, *trp1-289*, *his3-□1*, *MAL2-8c SUC2 Hxt1-17□*, *Gal2□*, *Stl1□*, 3 transportadores de maltosa delecionados con afinidad por glucosa, concretamente AGT1, YDL247w e YJR160c; casete genómico *Pro-HXT7::URA3*) no puede crecer en ninguna concentración de glucosa. Las deleciones en la cepa para proporcionar la "cepa *nula*", que se delecciona en todos los transportadores supuestos y transportadores de hexosa conocidos, se construyó usando el sistema *lox P*/recombinasa Cre (Gueldener *et al.*, 1996, Nucl. Acids Res., 24, pág. 2519). La cepa se hizo prototrófica (KOY.VW100) mediante transformación.

Quimeras

Se prepararon quimeras entre HXT1 y HXT7 usando el método basado en PCR "extensión por solapamiento *in vitro*" (Higushi *et al.*, 1981, Nucl. Acids Res., 16, págs. 7351-7367; Ho *et al.*, 1989, Gene, 71, págs. 51-59). Se amplificaron en primer lugar por separado las partes que van a fusionarse entre sí pero con extremos que pueden aparearse entre sí. En la segunda etapa de PCR, se usaron cebadores flanqueantes para permitir sólo la amplificación cuando había tenido lugar el apareamiento de los dos productos separados.

Para la preparación de TM4, se amplificó la parte de HXT1 de TM4 a partir del plásmido pTHXT1-2 (Reifenberger *et al.*, 1997, citado anteriormente describen la producción de pTHXT1-1 en la que el inserto de HindIII está en la orientación inversa en comparación con pTHXT1-2) usando los siguientes cebadores:

Cebador directo:

5' -CAAAGAATAA ACACAAAAC AAAAAGTTTT TTTAATTTTA
ATCAAAAAT GAATTCAACT CCGATCTAA TA-3'

Cebador inverso:

5'-GGAGATAAAA CGGCAATACC ACCGACACCT AAACCA-3'

Se amplificó la parte de HXT7 de TM4 a partir del plásmido P21 (Reifenberger *et al.*, 1995, Mol. Microbiol., 16, págs. 157-167) usando:

Cebador directo:

5'-TGTTTTAGGT GTCGGTGGTA TTGCCGTTTT ATCTCC-3'

Cebador inverso:

5'-TTTGTAGACG TGGGTCTGCA GGCA-3'

Para la preparación de TM6, se amplificó la parte de HXT1 de TM6 a partir del plásmido pTHXT1-2 usando los siguientes cebadores:

5 Cebador directo:

5' -CAAAGAATAA ACACAAAAAC AAAAAGTTTT TTTAATTTTA
ATCAAAAAAT GAATTCAACT CCGATCTAA TA-3'

Cebador inverso:

5'-CTGGAACAAA TGTCATACCA CCAATCATAA ATAAGGCCCA G-3'

10

Se amplificó la parte de HXT7 de TM6 a partir del plásmido P21 usando:

Cebador directo:

5'-CTGGGCCTTA TTTATGATTG GTGGTATGAC ATTTGTTCCA G-3'

15

Cebador inverso:

5'-TTTGTAGACG TGGGTCTGCA GGCA-3'

20

Se mezclaron los productos de las primeras dos reacciones separadas y se realizó una PCR en la que se usaron el cebador directo de la reacción de HXT1 y el cebador inverso de la reacción de HXT7. Puesto que se preparan los productos a partir de las dos primeras reacciones de un modo tal que tienen regiones solapantes, se obtiene un producto en el que las partes de HXT1 y HXT7 se fusionan entre sí.

25

Se preparó el constructo KOY.TM6P fusionando HXT1 y HXT7 en la sexta región transmembrana. El extremo N-terminal consiste en los pb 1-741 de HXT1 y el extremo C-terminal en 742-1713 de HXT7. Se preparó el constructo de TM4 mediante el mismo método usado para el constructo de TM6 pero los dos genes se fusionaron en la región TM 4. Para TM4, esto es los pb 1-551 de HXT1 y 552-1713 de HXT7.

Se introdujeron estos constructos en la cepa KOY.VW100, que se hizo prototrófica introduciendo URA3 antes de dicha introducción. El casete usado en el mutante nulo está ubicado en la antigua agrupación génica *HXT3-6-7* y contiene el promotor constitutivo del terminador *HXT7::K. lactis URA3::HXT7* y se preparó tal como sigue.

30

Construcción del casete de expresión genómico secuencia n.º 5 (SEQ ID No.: 21 en la lista de secuencias): Se integró un fragmento de promotor de *HXT7* de 392 pb en el genoma de la cepa EBY.VW4000 (Wieczorke *et al.*, 1999, citado anteriormente) en la antigua región de agrupación génica *HXT3-6-7* usando una modificación de la técnica de selección como diana con PCR, dando como resultado un casete de expresión de promotor-terminador de *HXT7* muy fuerte y constitutivo (véase Hauf *et al.*, 2000, Enzyme Microb. Technol., 26, págs. 688-698). Se amplificó parte del promotor de *HXT7* junto con parte de la región codificante de *HXT7* desde -392 hasta +30 mediante PCR con los cebadores PROHXT7-1 y PROHXT7-2 (véase a continuación), y el plásmido p21-PST (Reifenberger *et al.*, 1995, citado anteriormente) como molde. Se escindió el producto de PCR con SpeI en ambos extremos y se clonó en la orientación correcta en el sitio SpeI del plásmido pUG6 (Geldener *et al.*, 1996, citado anteriormente) detrás del segundo sitio *loxP*, dando como resultado el plásmido pUG6-kPHXT7. Se usó entonces este plásmido como molde para generar mediante PCR con los cebadores INTPH7-1 e INTPH7-2 una molécula de ADN que consiste en un casete marcador *kanMX-HXT7p* flanqueado por secuencias de homología cortas con el promotor de *HXT3* (de -770 a -720) y regiones de terminador de *HXT7*. Se transformó el producto de PCR de 2,4 kb en la cepa EBY.VW4000 (cuya agrupación génica *HXT3-6-7* se reemplaza por un sitio *loxP*), seleccionando por resistencia a G418 (200 mg litro⁻¹) en placas de agar YPMaltosa, y se usó para reemplazar la región de promotor de *HXT3-loxP* por el casete *kanMX-HXT7p*. Tras la transformación con el plásmido pSH47, se eliminó el marcador *kanMX* tal como se describe (Geldener *et al.*, 1996, citado anteriormente), dando como resultado la cepa EBY.VW4002.

45

Se amplificó el gen *HXT7* mediante PCR a partir del plásmido p21-PST con los cebadores C1-IHXT7 y C4-IHXT7. Se transformó el producto de PCR que contenía secuencias de homología cortas con el casete de expre-

5 sión de promotor-terminador de *HXT7* de la cepa EBY.VW4002 en esta cepa, seleccionando por crecimiento en placas de agar YPGlucosa. La integración en el casete de expresión genómico mediante recombinación homóloga dio como resultado la cepa JBY02 (*HXT7+*). Para construir un casete de expresión de marcador contraseleccionable de FOA (ácido 5-fluoroorótico) en la cepa EBY.VW4002, se amplificó por PCR el ORF de *URA3* de *K. lactis* a partir de la cepa MS7-62 (donación de C. Falcone, Roma) con los cebadores I-KURA31 e I-KURA32 (véase a continuación), dando como resultado un fragmento de ADN con el ORF de *KIURA3* flanqueado por regiones de homología cortas con el promotor de *HXT7* y el terminador de *HXT7*. Se transformó el fragmento de ADN en la cepa JBY02 seleccionando por crecimiento en un medio sintético sin uracilo y con maltosa como fuente de carbono, dando como resultado la cepa EBY.VW4003 que contenía un casete de expresión de *promotor de HXT7*^(-392 - +1) - *KIURA3* - *terminador de HXT7* integrado genómicamente. Esta cepa se hizo prototrópica (KOY.VW100) mediante transformación.

PROHXT7:

5'-GGACTAGTGA TATCTCTCGT AGGAACAATTCGG-3'

15 PROHXT7-2:

5'-GGACTAGTTG CTCTGCAATAGCAGCGTC-3'

INTPH7-1:

5' - CCTATTCGTC ATCGCAGACA GCCTTCATCTTCTCGAGATA ACACCTGGAG
CGCGCGTTTC GGTGATGACG-3'

20

INTPH7-2:

5' - AAGTTTCTTT GTCTCCGTCC CACTCAACTTTCTGAGAACA AATGATCCAT
TTTTTGATTA AAATTA AAAA AAC-3'

C1-IHXT7:

25 5'-CCTGCGTGTT CTTCTGAGGTTTC-3'

C4-IHXT7:

5'-TTTGTAGACG TGGGTCTGCAGGCA-3'

30 I-KURA31:

5' - CAAAGAATAA ACACAAAAC AAAAAGTTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAT
GTCCACAAA TCATATACCAGTAG-3'

I-KURA32:

5' - GCACAAATTA GAGCGTGATC ATGAATTAATAAAAGTGTTTC GCAAATTAAT
GGGGAGCGCT GATTCTCTTT TG-3'

35 Se realizó la integración de los diferentes genes o constructos usando recombinación homóloga. Se seleccionaron las recombinaciones en placas de YPGlucosa (YPD glucosa al 2%) y entonces se sembraron en placa réplicas en placas de 5-FOA-YNB Maltosa al 2% para seleccionar por recombinación no homóloga de *URA3*. Para preparar las cepas prototrópicas, se reintrodujo el *URA3* mediante transformación y recombinación homóloga.

ES 2 421 726 T3

Las quimeras o genes de tipo natural que se han integrado en la cepa constituyen el único transportador de hexosa.

Las cepas prototrópicas usadas en estos experimentos son KOY.PK2-1C83 de tipo natural, KOY.VW100, KOY.VWTM6P, KOY.VW101P y KOY.VW102P "mutantes nulos".

5 Las cepas usadas y generadas se resumen en la siguiente tabla:

<u>Cepa</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Fuente</u>
KOY.PK2-1C83	MATa MAL2-8c SUC2	Auxotrópica: K-D Entian (Van Dijken <i>et al.</i> , 2000, <i>Enzyme Microb. Technol.</i> , 26, págs. 706-714 Prototrópica: Este estudio
KOY.VW100	MATa MAL2-8c SUC2 hxt17ΔA 112ura3-52 gal2Δ: :loxP stl1Δ::loxP agt1Δ: :loxP ydl247wΔ::loxP yjr160cΔ: :loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ: :loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ: :loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ: :loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ: :loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ: :loxP hxt2Δ::loxP Hxt367Δ::loxP Casete de integración: promotor constitutivo fuerte (ubicado en el antiguo sitio de HXT367) de HXT7, el ORF de URA3 de <i>K. lactis</i> para contraselección con 5-FOA y terminador de HXT7.	Auxotrópica: Eckhard Boles (Wieczorke <i>et al.</i> , 1999, citado anteriormente) y este estudio Prototrópica: Este estudio

ES 2 421 726 T3

KOY.TM4	KOY.VW100 con constructo de TM4 integrado en el casete con recombinación no homóloga posterior de URA3 de <i>K. lactis</i> en el casete. URA3 reintroducido para obtener una cepa prototrópica	Este estudio
KOY.TM6P	KOY.VW100 con constructo de TM6 integrado en el casete con recombinación no homóloga posterior de URA3 de <i>K. lactis</i> en el casete. URA3 reintroducido para obtener una cepa prototrópica	Este estudio
KOY.VW101P	Constructo de HXT1 de KOY.VW100 integrado en el casete con recombinación no homóloga posterior de URA3 de <i>K. lactis</i> en el casete. URA3 reintroducido para obtener una cepa prototrópica	Este estudio
KOY.VW102P	Constructo de HXT7 de KOY.VW100 integrado en el casete con recombinación no homóloga posterior de URA3 de <i>K. lactis</i> en el casete. URA3 reintroducido para obtener una cepa prototrópica	Este estudio

La secuencia de proteína de TM6 es tal como sigue – Secuencia n.º 1 (SEQ. ID NO. 17 en la lista de secuencias):

```

MNSTPDLISP QKSNSSNSYE LESGRSKAMN TPEGKNESFH DNLSESQVQP
AVAPPNTGKG VYVTVSICCV MVAFGGFIFG WDTGTISGFV AQTDFLRRFG
MKHHDGSHYL SKVRTGLIVS IFNIGCAIGG IVLAKLGDMY GRRIGLIVVV
VIYTGIIIQ IASINKWYQY FIGRIISGLG VGGITVLSPM LISEVAPSEM
RGTLVSCYQV MITLGIIFLG CTNFGTKNYS NSVQWRVPLG LCFAWALFMI
GGMTFVPESP RYLAEVGKIE EAKRSIAVYN KVAVDDPSVL AEVEAVLAGV
EAEKLAGNAS WGELFSSKTK VLQRLIMGAM IQSLQQLTGD NYFFYYGTTI
FKAVGLSDSF ETSIVLGIVN FASTFVGIYV VERYGRRTCL LWGAASMTAC
MVVYASVGVT RLWPNGQDQP SSKGAGNCMI VFACFYIFCF ATTWAPIPYV
VVSETFPLRV KSKAMSIATA ANWLWGFLIG FFTPFITGAI NFYYGYVFMG
CLVFMFFYVL LVVPETKGLT LEEVNTMWE E GVLPWKSASW VPPSRRGANY
5 DAEEMTHDDK PLYKRMFSTK

```

En la posición 279 anterior, TM6 contiene un residuo de tirosina (mostrado en negrita). Esto representa una modificación en relación con la secuencia que se produce de manera natural HXT1 en la que el residuo es serina. Como tal, la modificación en este residuo o residuos comparables en otros transportadores forma una característica preferida adicional de la invención. Sin embargo, también se incluyen dentro del alcance de esta invención

5

secuencias en las que la posición 279 es un residuo de serina en la secuencia anterior.

La secuencia de proteína de TM4 es tal como sigue – Secuencia n.º 2 (SEQ. ID NO. 18 en la lista de secuencias):

```
MNSTPDLISP QKSNSSNSYE LESGRSKAMN TPEGKNESFH DNLSESQVQP
AVAPPNTGKG VYVTVSICCV MVAFGGFI FG WDTGTISGFV AQTDFLRRFG
MKHHDGSHYL SKVRTGLIVS IFNIGCAIGG IVLAKLGDMY GRRIGLIVVV
VIYTIGIIIQ IASINKWYQY FIGRIISGLG VGGIAVLSPM LISEVSPKHL
RGTLVSCYQL MITAGIFLGY CTNFGTKNYS NSVQWRVPLG LCFAWALFMI
GGMTFVPESP RYLAEVGKIE EAKRSIAVSN KVAVDDPSVL AEVEAVLAGV
EAEKLAGNAS WGELFSSKTK VLQRLIMGAM IQSLQQLTGD NYFFYYGTTI
FKAVGLSDSF ETSIVLGIVN FASTFVGIYV VERYGRRRTCL LWGAASMTAC
MVVYASVGVV RLWPNQDQP SSKGAGNCMI VFACFYIFCF ATTWAPIPYV
VVSETFPLRV KSKAMSIATA ANWLWGFLIG FFTPFITGAI NFYYGYVFMG
CLVFMFFYVL LVPVETKGLT LEEVNTMWE E GVLPWKSASW VPPSRRGANY
DAEEMTHDDK PLYKRMFSTK*
```

Constructos funcionales que se han identificado son TM 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12. Estos constructos, que forman aspectos preferidos de la invención, se preparan usando la siguiente porción de HXT1: 1-231 (TM1), 1-391 (TM2), 1-449 (TM3), 1-551 (TM4), 1-627 (TM5), 1-741 (TM6), 1-1010 (TM7), 1-1108 (TM8), 1-1214 (TM9), 1-1293 (TM10), 1-1438 (TM11), 1-1504 (TM12), con el resto constituido por HXT7, por ejemplo 232-1713 en el caso de TM1. No se han identificado aún transformantes para TM7, 8, 9.

10

Se ha depositado *Saccharomyces cerevisiae* KOY.TM6P según el Tratado de Budapest el 20 de junio de 2000 en la Deutsche Sammlung Mikroorganismen con el número de depósito DSM 13555.

15

Se ha depositado *Saccharomyces cerevisiae* KOY.TM4P según el Tratado de Budapest el 6 de noviembre de 2000 en la Deutsche Sammlung Mikroorganismen con el número de depósito DSM 13832.

Caracterización del crecimiento

Resultados

Crecimiento aerobio: Se muestra un comportamiento de crecimiento diaúxico para *S. cerevisiae* durante el cultivo discontinuo aerobio sobre glucosa en la figura 1 y se realizó tal como se describió anteriormente, es decir, en el medio usado por Verduyn *et al.* (1992, citado anteriormente) a pH 5,00 en presencia de glucosa 5 mM, con un cultivo de partida de 0,3 - 0,7 g de biomasa seca en fermentadores de 1,5 l, con agitación a 1500 rpm y un flujo de entrada de aire de 0,5 volúmenes de aire por volumen de recipiente por minuto (vvm). La primera fase observada en la figura 1 se debe al consumo de glucosa con la producción concomitante de etanol y biomasa. Durante la segunda fase, el etanol sirve como fuente de carbono y energía principal. Sin embargo, durante el crecimiento de KOY.TM6P, se observa una única fase de crecimiento (figura 2). Aparentemente, el azúcar se convierte inmediatamente en dióxido de carbono y agua sin formación de etanol, es decir, son prevalentes condiciones desreprimidas. Durante estas condiciones, se obtuvo un tiempo de generación de 3,8 h. Esto puede calcularse a partir de la figura 7 que muestra el gráfico semilogarítmico de la biomasa frente al tiempo. La concentración de etanol máxima era inferior a 0,12 g/l cuando se usaba una concentración de glucosa de 20 g/l. También se encontraron en cantidades insignificantes otros subproductos tales como glicerol y acetato. También se verificaron condiciones desreprimidas mediante el hecho de que las mediciones en línea de la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de formación de dióxido de carbono revelaron un cociente respiratorio (CR = tasa de formación de dióxido de carbono / tasa de consumo de oxígeno) próximo a 1. Figura 3.

20

25

30

35

KOY.TM4P también mostró un comportamiento de crecimiento muy similar a KOY.TM6P (figura 5). Se ha mostrado que el tiempo de generación calculado a partir del gráfico semilogarítmico de la densidad óptica frente al tiempo es de 3 a 3,9 h (figura 6). La producción de etanol máxima medida fue de 0,15 g/l cuando se usaron 20 g/l de glucosa en el medio. Como con KOY.TM6P, se encontraron glicerol y ácido acético a concentraciones muy

40

5 Crecimiento anaerobio: La cepa, KOY.TM6P, puede producir etanol durante condiciones anaerobias. Sin embargo, parece que tras una fase inicial de actividad bastante alta (tal como se indica mediante las tasas de producción de etanol y crecimiento específicas) un factor aún no identificado se convierte en limitante. Este factor no puede ser el esteroil esencial ergosterol, puesto que se añadieron al cultivo complementos que se sabe que son necesarios.

Cinética de captación

10 Se han realizado ensayos de captación de glucosa usando glucosa radiomarcada (Walsh *et al.*, 1994, citado anteriormente). Se hicieron crecer las células en un medio definido que contenía glucosa al 2%. Se recogieron las células a $DO_{610}=1$. Se lavaron las células y se resuspendieron en tampón fosfato de potasio 100 mM hasta una concentración de proteína de aproximadamente 8-15 mg/ml. Se incubaron las células con glucosa radiomarcada durante aproximadamente 5 s y se determinó la cantidad de glucosa intracelular mediante un contador de centelleo líquido.

15 La cepa que expresa *HXT1* (que expresa la proteína de transporte de baja afinidad más abundante) mostró una cinética de captación similar que el componente de captación de baja afinidad en el tipo natural. Sorprendentemente, la cepa que expresa *HXT7*, que expresa la proteína de alta afinidad más abundante, mostró aproximadamente el mismo comportamiento de crecimiento que el tipo natural y la cepa que expresa *HXT1* (datos no mostrados). La única diferencia significativa era que esta última tenía una transición mucho más repentina durante la fase diaxica cuando el cultivo cambia de respiro-fermentativo a crecimiento respiratorio. En otras palabras, la $V_{m\acute{a}x.}$ mucho más baja del sistema de captación en la cepa de *HXT7* en comparación con la del tipo natural y la cepa de *HXT1* no parece restringir el consumo de glucosa o la tasa de crecimiento. Más bien parece que la K_m para la captación presentada por la cepa es el factor que determina un cambio metabólico suave de glucosa a otra fuente de carbono y energía. Sin embargo, valores de $V_{m\acute{a}x.}$ incluso inferiores, tal como se obtienen para las cepas TM, parecen limitar el crecimiento, dando como resultado tasas de crecimiento disminuidas (datos no mostrados).

25 Tabla 1. Datos de la cinética de captación con glucosa como sustrato

Cepa	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x.}$ (nmol/min. mg de proteína)
WT (CEN.PK) ^a	67±14 ^b 1,2±1,2 ^b	818±93 ^b 80±80 ^b
HXT1	50-100	690
HXT7	2-3	80
TM1	2-3	35
TM4	4-6	80
TM6	7	38
TM12	60	150

^a Datos de la bibliografía (Diderich *et al.*, 2000, en "Animating the celular map", Stellenbosch University Press, Sudáfrica, IBSN 0-7972-0776-7, págs. 271-275)

30 ^b Los valores superiores se refieren al sistema de captación de baja afinidad y los valores inferiores al sistema de captación de alta afinidad.

Los resultados obtenidos para las diversas cepas descritas en este ejemplo pueden resumirse tal como sigue:

	Tipo natural	HXT1	HXT7	TM4	TM6
Tiempo de generación (h)	2	2,5	2,7	3-3,9	3,8
Rendimiento de crecimiento (biomasa/g de glucosa)	0,3-0,5	0,3-0,35	0,33-0,38	0,34-0,37	0,41
Consumo de glucosa (mmol de glucosa/(g de biomasa.h))	10	10	<10	2,5	3-4
Tasa de consumo de O ₂ (mmol de O ₂ /(g de biomasa.h))	2-2,5	3-4	2,2-6,1*	n.d.	3-4,5
Producción de etanol (g/l)	7	6,2	5,2	0,15	0,12

* Refleja un aumento continuo durante el cultivo discontinuo.

n.d.: no determinado

5 Secuencia n.º 1 (SEQ ID NO. 17 en la lista de secuencias):

Región de transportador de hexosa de *Saccharomyces cerevisiae* KOY.TM6P pb 1-741 de HXT1 y pb 742-1713 de HXT7.

MNSTPDLISP QKSNSSNSYE LESGRSKAMN TPEGKNESFH DNLSESQVQP
 AVAPPNTGKG VYVTVSICCV MVAFGGFIFG WDTGTISGFV AQTDFLRRFG
 MKHHDGSHYL SKVRTGLIVS IFNIGCAIGG IVLAKLGDMY GRRIGLIVVV
 VIYTIIGIIIQ IASINKWYQY FIGRIISGLG VGGITVLSPM LISEVAPSEM
 RGTLVSCYQV MITLGIIFLGY CTNFGTKNYS NSVQWRVPLG LCFAWALFMI
 GGMTFVPESP RYLAEVGKIE EAKRSIAVYN KVAVDDPSVL AEEVEAVLAGV
 EAEKLAGNAS WGELFSSKTK VLQRLIMGAM IQSLQQLTGD NYFFYYGTTI
 FKAVGLSDSF ETSIVLGIVN FASTFVGIYV VERYGRRTCL LWGAASMTAC
 MVVYASVGVT RLWPNGQDQP SSKGAGNCMI VFACFYIFCF ATTWAPIPYV
 VVSETFPLRV KSKAMSIATA ANWLWGFLIG FFTPFITGAI NFYYGYVFMG
 CLVFMFFYVL LVVPETKGLT LEEVNTMWEE GVLWPKSASW VPPSRRGANY
 DAEEMTHDDK PLYKRMFSTK

Secuencia n.º 2 (SEQ. ID NO. 18 en la lista de secuencias):

10 Región de transportador de hexosa de *Saccharomyces cerevisiae* KOY.TM4P pb 1-551 de HXT1 y pb 552-1713 de HXT7.

ES 2 421 726 T3

MNSTPDLISP QKSNSSNSYE LESGRSKAMN TPEGKNESFH DNLSESQVQP
AVAPPNTGKG VYVTVSICCV MVAFGGFIFG WDTGTISGFV AQTDFLRRFG
MKHHDGSHYL SKVRTGLIVS IFNIGCAIGG IVLAKLGDMY GRRIGLIVVV
VIYTGIIIQ IASINKWYQY FIGRIISGLG VGGIAVLSPM LISEVSPKHL
RGTLVSCYQL MITAGIFLGY CTNFGTKNYS NSVQWRVPLG LCFAWALFMI
GGMTFVPESP RYLAEVGKIE EAKRSIAVSN KVAVDDPSVL AEVEAVLAGV
EAEKLAGNAS WGELFSSKTK VLQRLIMGAM IQSLQQLTGD NYFFYYGTTI
FKAVGLSDSF ETSIVLGIVN FASTFVGIYV VERYGRRTCL LWGAASMTAC
MVVYASVGVV RLWPNGQDQP SSKGAGNCMI VFACFYIFCF ATTWAPIPYV
VVSETFPLRV KSKAMSIATA ANWLWGFLIG FFTPFITGAI NFYYGYVFMG
CLVFMFFYVL LVVPETKGLT LEEVNTMWEE GVLPWKSASW VPPSRRGANY
DAEEMTHDDK PLYKRMFSTK*

Secuencia n.º 3 (SEQ ID NO. 19 en la lista de secuencias): TM4 – secuencia de nucleótidos

ES 2 421 726 T3

atgaattcaa ctcccgatct aatatctcct cagaaatcca attcatccaa
 ctcatatgaa ttggaatctg gtcggttcaaa ggccatgaat actccagaag
 gtaaaaaatga aagttttcac gacaacttaa gtgaaagtca agtgcaaccc
 gccgttgccc ctccaaacac cggaaaaggt gtctacgtaa cggtttctat
 ctgttggtgtt atgggttgctt tccggtggttt catatttgga tgggatactg
 gtaccatttc tgggttttggt gctcaaactg attttctaag aagatttggt
 atgaagcacc acgacggtag tcattacttg tccaaggtga gaactgggtt
 aattgtctct atttttaaca ttgggttggtc cattgggtgg atcgtcttag
 ccaagctagg tgatatgtat ggtcgtagaa tccggtttgat tgtcgttgta
 gtaatctaca ctatcgggat cattattcaa atagcctcga tcaacaagtg
 gtaccaatat ttcattggta gaattatctc tgggttaggt gtcggtggta
 ttgccgtttt atctcctatg ttgatttctg aagtatcccc aaagcattta
 aggggtactt tagtctcttg ctaccaattg atgattactg ccggtatttt
 cttgggttac tgtaccaact tccggtactaa gaactactcc aactctgtgc
 aatggagagt tccattaggt ttgtgttttg cctgggcttt gtttatgatt
 ggtggtatga catttggtcc agagtctcca cgttatttgg ctgaagtcgg
 taagatcgaa gaagccaaac gttctattgc cgtttctaac aagggtgctg
 ttgatgatcc atctgttttg gctgaagtcg aagctgtctt ggctgggtga
 gaggcagaga aattagctgg taatgcatcc tggggatgaat tgtttagtag
 caagacaaag gtccttcagc gtttgatcat ggggtgctatg attcaatctc
 tacaacaatt gacaggtgat aactatttct tctactatgg tactactatt
 ttcaaggctg ttgggttgag tgactcttc gaaacctcta ttgtcttggg
 tattgttaac tttgcttcca cctttggttg tatttacggt gttgagagat
 atgggtcgtc tacttggttg ctatggggtg ctgcatccat gactgcttgt
 atgggtgtct atgcttccgt ggggtgcacc agattatggc caaatgggtca
 agaccaacca tcttccaagg gtgctggtaa ctgtatgatt gtctttgcct
 gtttctatat tttctgtttt gctactacat gggctccaat tccttatgtc
 gttgtttctg aaactttccc attgagagtc aagtctaagg ctatgtctat
 tgctacagct gctaattggg tgtgggggtt cttgattggg ttcttcactc
 catttattac tgggtgctatt aacttctact acggttacgt tttcatgggc
 tgtttggtct tcatgttctt ctatgttttg ttagttgttc cagaaactaa
 gggtttgact ttggaagaag tcaacacat gtgggaagaa ggtgttctac
 catggaagtc tgcctcatgg gttccacat ccagaagagg tgccaactac
 gacgctgaag aatgactca cgatgacaag ccattgtaca agagaatggt
 cagcaccaaa taa

Secuencia n.º 4 (SEQ ID NO. 20 en la lista de secuencias): TM6 – secuencia de nucleótidos

ES 2 421 726 T3

atgaattcaa ctcccgatct aatatctcct cagaaatcca attcatccaa
 ctcatatgaa ttggaatctg gtcgttcaaa ggccatgaat actccagaag
 gtaaaaatga aagttttcac gacaacttaa gtgaaagtca agtgcaaccc
 gccgttgccc ctccaaacac cggaaaaggt gtctacgtaa cggtttctat
 ctgttggtgtt atggttgctt tcggtgggtt catatttgga tgggatactg
 gtaccatttc tggttttggt gctcaaactg attttctaag aagatttggt
 atgaagcacc acgacggtag tcattacttg tccaaggatga gaactggttt
 aattgtctct atttttaaca ttggttgtgc cattgggtgg atcgtcttag
 ccaagctagg tgatatgtat ggtcgtagaa tcggtttgat tgcggttga
 gtaatctaca ctatcgggat cattattcaa atagcctcga tcaacaagtg
 gtaccaatat ttcatggta gaattatctc tggtttaggt gtcggtggta
 tcacagtttt atctcccatg ctaatatctg aggtcgcccc cagtgaaatg
 agaggcacct tggtttcatg ttaccaagtc atgattactt taggtatfff
 cttaggttac tgtaccaatt ttggtacca gaattactca aactctgtcc
 aatggagagt tccattagggt ttgtgtttcg cctgggcctt atttatgatt
 ggtggtatga catttgttcc agagtctcca cgttatftgg ctgaagtcgg
 taagatcgaa gaagccaaac gttctattgc cgtttataac aaggttgctg
 ttgatgatcc atctgttttg gctgaagtcg aagctgtctt ggctgggtga
 gaggcagaga aattagctgg taatgcatcc tggggatgaat tgtttagtag
 caagacaaag gtccttcagc gtttgatcat ggggtgctatg attcaatctc
 tacaacaatt gacaggtgat aactatftct tctactatgg tactactatt
 ttcaaggctg ttggtttgag tgactctttc gaaacctcta ttgtcttggg
 tattgttaac tttgcttcca cttttgftgg tattttacgtt gttgagagat
 atggtcgctg tacttgfttg ctatgggggtg ctgcatccat gactgcttgt
 atggttgtct atgcttccgt ggggtgcacc agattatggc caaatgggtca
 agaccaacca tcttccaagg gtgctggtaa ctgtatgatt gtctttgcct
 gtttctatat tttctgtttt gctactacat gggctccaat tccttatgtc
 gttgfttctg aaactttccc attgagagtc aagtctaagg ctatgtctat
 tgctacagct gctaattgggt tgtgggggtt cttgattgggt ttcttctactc
 catttattac tgggtgctatt aacttctact acggttacgt tttcatgggc
 tgtttgggtct tcatgttctt ctatgtfttg ttagttgttc cagaaactaa
 gggfttgact ttggaagaag tcaacacat gtgggaagaa ggtgttctac
 catggaagtc tgcctcatgg gttccacat ccagaagagg tgccaactac
 gacgctgaag aatgactca cgatgacaag ccattgtaca agagaatgft
 cagcaccaaa taa

Secuencia n.º 5 (SEQ ID NO. 21 en la lista de secuencias): Secuencia de casete de expresión – secuencia de nucleótidos

ES 2 421 726 T3

tctcgtagga acaatthtcgg gccctgcgt gttcttctga ggttcatctt
 ttacatttgc ttctgctgga taatthtcag aggcaacaag gaaaaattag
 atggcaaaaa gtcgtctttc aaggaaaaat cccaccatc tttcgagatc
 cctgtaact tattggcaac tgaaagaatg aaaaggagga aaatacaaaa
 tatactagaa ctgaaaaaaa aaaagtataa atagagacga tatatgccaa
 tacttcacaa tgttcgaatc tattcttcat ttgcagctat tgtaaaataa
 taaaacatca agaacaaaca agctcaactt gtcttttcta agaacaaaga
 ataaacacaa aaacaaaaag tttttttaat tttaatcaaa aaatgtccac
 aaaatcatat accagtagag ctgagactca tgcaagtccg gttgcatcga
 aactthtacg tttaatggat gaaaagaaga ccaatthtggt tgcttctctt
 gacgttcggt cgactgatga gctattgaaa cttgttgaaa cgttgggtcc
 atacatttgc cthttgaaaa cacacgthga tatcttggat gatttcagtt
 atgagggtac tgtcgttcca ttgaaagcat tggcagagaa atacaagttc
 ttgatatttg aggacagaaa attcgcgat atcggtaaca cagtcaaatt
 acaatataca tcgggcgtht accgtatcgc agaatggtct gatatcacca
 acgcccacgg ggttactggt gctggtattg ttgctggctt gaaacaaggt
 gcgcaagagg tcaccaaaga accaagggga ttattgatgc ttgctgaatt
 gtcttccaag ggttctctag cacacgthga atatactaag ggtaccgthg
 atattgcaaa gagtgataaa gatttcgtht ttgggttcat tgctcagaac
 gatatgggag gaagagaaga aggtthtgat tggctaataca tgaccccagg
 ttaggttht gacgacaaag gcgatgcatt gggtcagcag tacagaaccg
 tcgacgaagt tgtaagtggg ggatcagata tcatcattgt tggcagagga
 cthttcgcga aggttagaga tcctaaggtt gaaggtgaaa gatacagaaa
 tgctggatgg gaagcgtacc aaaagagaat cagcgtccc cattaatttg
 cgaacactth tattaattca tgatcacgct ctaatthtggt catttgaaat
 gtactctaata tctaatttht tattthttaat gatattctga aaagtaataa
 cgtthtttht atatacaaaa taatacagth taatthtcaa gthttthgatc
 atttgthctc agaaagthga gtgggacgga gacaaagaaa cthtaagag
 aatgcaaag tgggaagaag tcagthgtht accgaccgca ctgthattca
 caaatattcc aatthtgcct gcgacccac gtctacaaat thtggttagt
 thggtaaatg gtaaggatat agtagagcct thttgaaatg ggaaatatct
 tctthttctg tatcccgtct caaaaagtht ctaatgagth agthatttht
 thcttactca tcgcccgtca cthaaaagaa gaaaaattac thtcatgatg
 cgaagcga aaaatthttt gthtcaattt tcacaatgca tct

REIVINDICACIONES

1. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada que produce niveles inferiores de etanol que levadura de tipo natural en condiciones aerobias y concentraciones de sacáridos de 5 mM o más y que presenta una tasa de crecimiento de al menos el 30% de la de la levadura de tipo natural, conteniendo dicha levadura una secuencia de nucleótidos quimérica (un constructo quimérico) que se transforma de manera estable en el material genético de la levadura, en la que el constructo comprende una secuencia que tiene la forma
- 5 A-B
- en la que
- A es una primera secuencia que comprende las bases de nucleótidos w a x;
- 10 B es una segunda secuencia que comprende las bases de nucleótidos (x+y) a z;
- en la que
- A es de una secuencia de nucleótidos que codifica para un transportador de sacáridos de baja afinidad HXT-1 o HXT-3 de la levadura *Saccharomyces* o una secuencia que se hibrida con la secuencia codificante en condiciones de unión no rigurosas de 6 x SSC/formamida al 50% a temperatura ambiente y lavado en condiciones de alta rigurosidad o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la secuencia codificante o una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente
- 15 y
- B es de una secuencia de nucleótidos que codifica para un transportador de sacáridos de alta afinidad HXT-2, 4, 6, 7 o GAL2P de la levadura *Saccharomyces* o una secuencia que se hibrida con la secuencia codificante en condiciones de unión no rigurosas de 6 x SSC/formamida al 50% a temperatura ambiente y lavado en condiciones de alta rigurosidad o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la secuencia codificante o una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente
- 20 y
- los valores w y x son las posiciones de nucleótidos primera y segunda dentro de la secuencia de nucleótidos de dicho transportador de sacáridos de baja afinidad y (x+y) y z son las posiciones de nucleótidos primera y segunda dentro de la secuencia de nucleótidos de dicho transportador de sacáridos de alta afinidad, y;
- w es de 1 a 50;
- 30 x es un número desde 400 hasta 900;
- y es inferior a 3; y
- z es de desde 1600 hasta 1713,
- produciendo dicha levadura menos del 50% de etanol en comparación con la levadura de tipo natural.
2. Levadura según la reivindicación 1, en la que dicho transportador de sacáridos es un transportador de glucosa.
- 35 3. Levadura según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha concentración de sacáridos es glucosa al 2%.
4. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, produciendo dicha levadura menos de 0,6 g/l de etanol.
5. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, produciendo dicha levadura menos de 0,25 g/l de etanol.
- 40 6. Levadura según la reivindicación 5, produciendo dicha levadura menos de 0,12 g/l de etanol.
7. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, presentando dicha levadura una tasa de crecimiento de al menos el 50% de la de la levadura de tipo natural.
8. Levadura según la reivindicación 7, presentando dicha levadura una tasa de crecimiento de al menos el 70% de la de la levadura de tipo natural.
- 45

9. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho constructo comprende secuencias de HXT-1 y HXT 7 o una secuencia que se hibrida con la secuencia codificante en las condiciones definidas en la reivindicación 1 o tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la misma o una secuencia complementaria de la misma.
- 5 10. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que x es una posición en la secuencia de nucleótidos abarcada por los tramos transmembrana tercero a noveno de HXT1 o HXT7 o una secuencia que se hibrida con la secuencia codificante en las condiciones definidas en la reivindicación 1 o tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la misma o una secuencia complementaria de la misma.
11. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que x = 525-575 y/o 720-770.
- 10 12. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que x = 551 ó 741, w e y = 1 y z = 1713.
13. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho constructo quimérico codifica para un polipéptido quimérico con un total de 10 a 14 dominios transmembrana.
14. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicho constructo comprende:
- 15 los nucleótidos 1-449 de HXT-1 y los nucleótidos 450-1713 de HXT-7;
los nucleótidos 1-551 de HXT-1 y los nucleótidos 552-1713 de HXT-7;
los nucleótidos 1-627 de HXT-1 y los nucleótidos 628-1713 de HXT-7;
o una molécula de ácido nucleico que se hibrida con dicho constructo en las condiciones según la reivindicación 1 o tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la secuencia de dicho constructo.
- 20 15. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, siendo la célula de levadura en la que se introduce dicho constructo quimérico una cepa nula sin propiedades de transporte de sacáridos.
16. Levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que dicho constructo quimérico comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para las secuencias n.^{os} 1 ó 2 o comprende la secuencia de nucleótidos de las secuencias n.^{os} 3 ó 4 o una molécula que se hibrida con dicho constructo o con las secuencias n.^{os} 3 ó 4 en las condiciones definidas en la reivindicación 1, o tiene una identidad de al menos el 95% con la secuencia de dicho constructo o con las secuencias n.^{os} 3 ó 4.
- 25 17. Levadura según la reivindicación 15 ó 16 denominada *Saccharomyces cerevisiae* KOY.TM4P o KOY.TM6P que tiene el número de depósito DSM (Deutsche Sammlung Mikroorganismen) 13832 o DSM 13555, respectivamente.
- 30 18. Molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o una secuencia complementaria a la misma.
19. Vector o célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 18.
20. Polipéptido que comprende una secuencia codificada por la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 18, comprendiendo dicho polipéptido un transportador de sacáridos quimérico funcional.
- 35 21. Método de inserción de material genético exógeno en una célula de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para proporcionar una célula de levadura que produce un producto, comprendiendo dicho método al menos las etapas de introducir dicho material en dicha célula, en el que dicho material exógeno codifica para dicho producto o parte del mismo o codifica para un polipéptido o parte del mismo que facilita la producción directa o indirecta de dicho producto o parte del mismo, o que afecta a la expresión de dicho polipéptido o producto.
- 40 22. Método según la reivindicación 21, en el que dicho material genético exógeno que va a introducirse en dicha célula está contenido dentro de un vector.
23. Método según la reivindicación 21 ó 22, en el que dicho producto es un metabolito de peso molecular alto o bajo, un producto químico fino o a granel, un producto alimenticio, un alimento funcional o un agente terapéutico.
- 45 24. Método según la reivindicación 21 ó 22, en el que dicho producto es un aminoácido, un péptido, un polipéptido, un azúcar, un poliol pequeño o CO₂.
25. Célula de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que se ha insertado material genético exógeno según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 para proporcionar una célula de levadura que produce un producto.
- 50

26. Método de preparación de un producto, que comprende hacer crecer células de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 25 en condiciones aerobias en presencia de altas concentraciones de sacáridos.

5 27. Método según la reivindicación 26, que comprende adicionalmente la etapa de aislar el producto así formado.

28. Método según la reivindicación 26 ó 27, en el que dicho producto es una bebida baja en alcohol o no alcohólica.

29. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que dichas células se hacen crecer en presencia de glucosa.

10

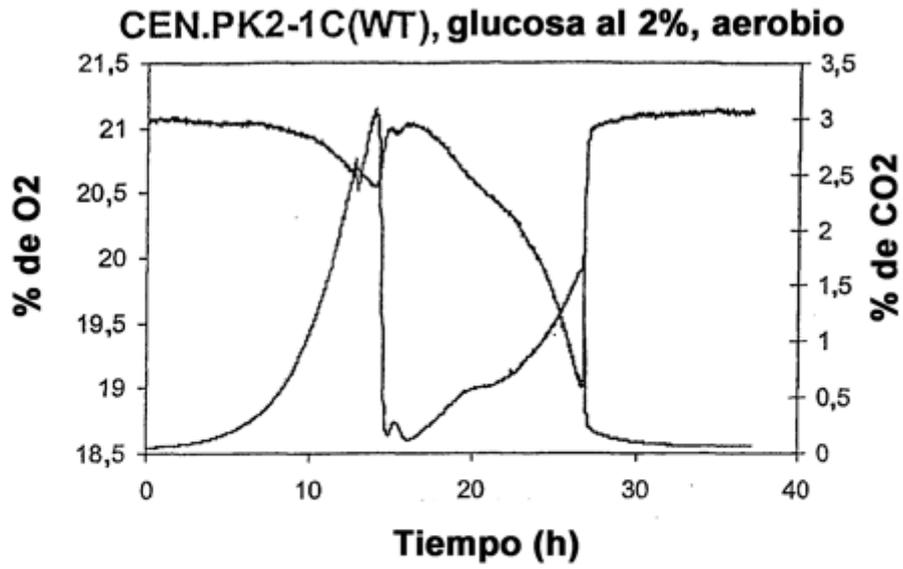


Figura 1

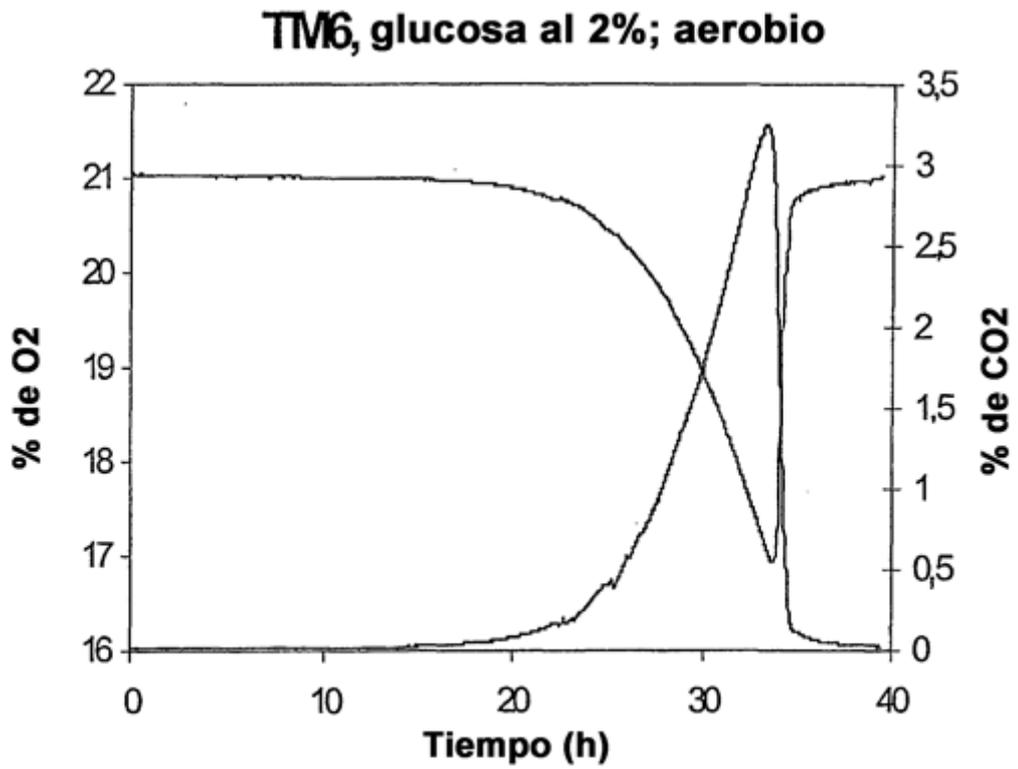


Figura 2

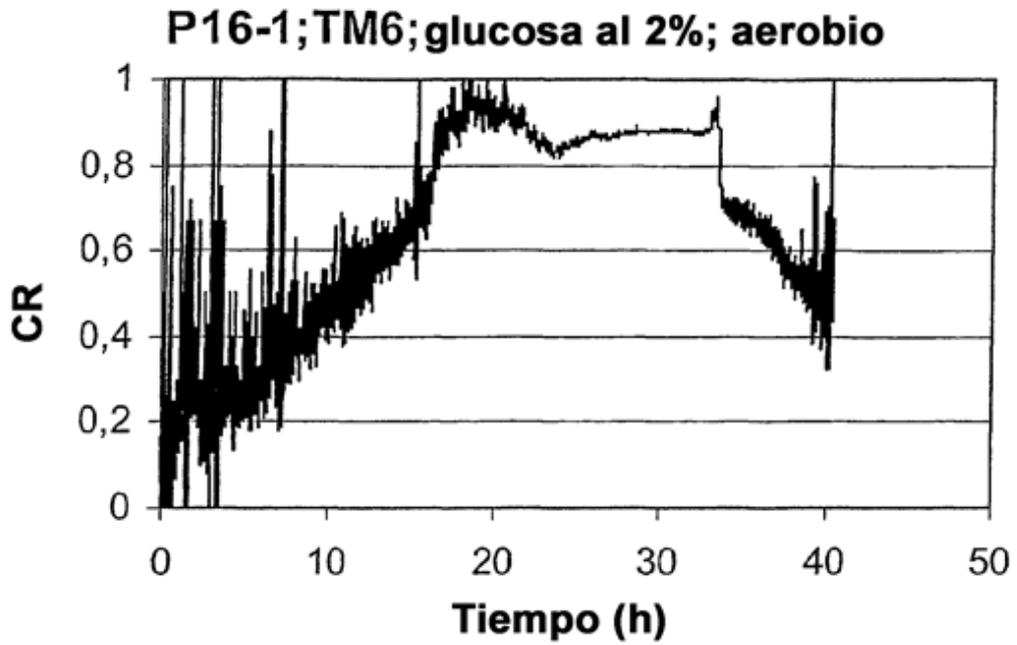


Figura 3

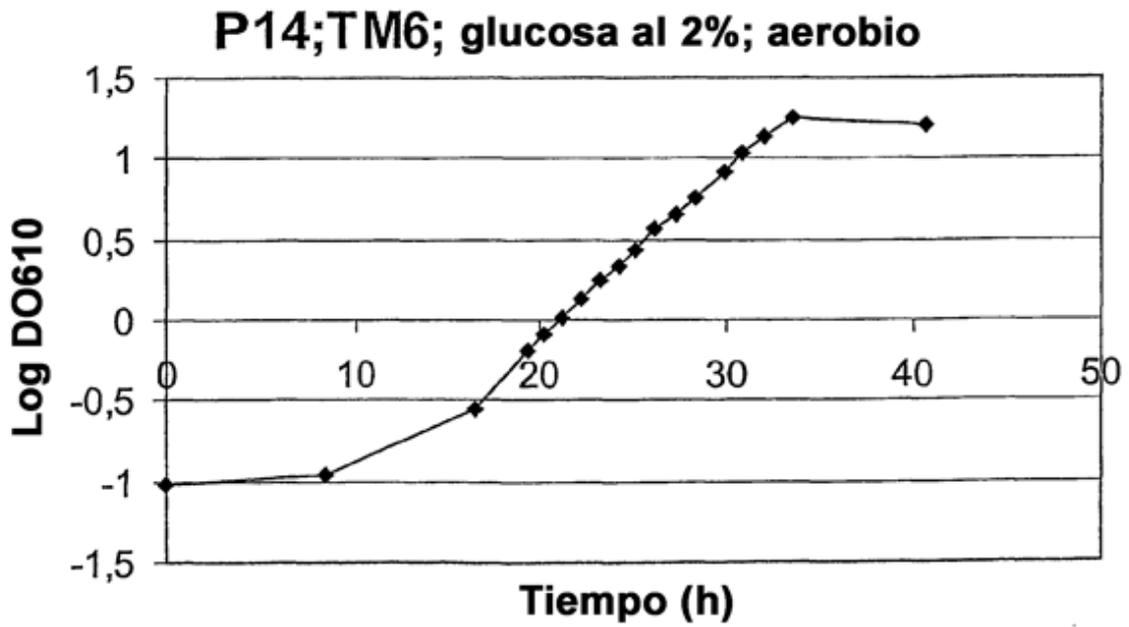


Figura 4

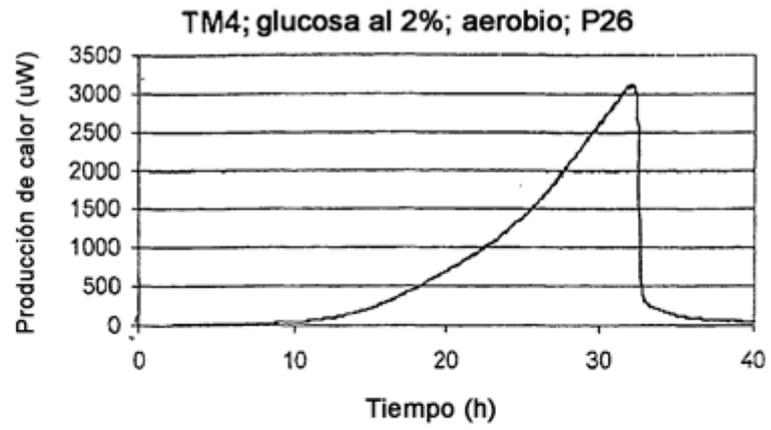


Figura 5.

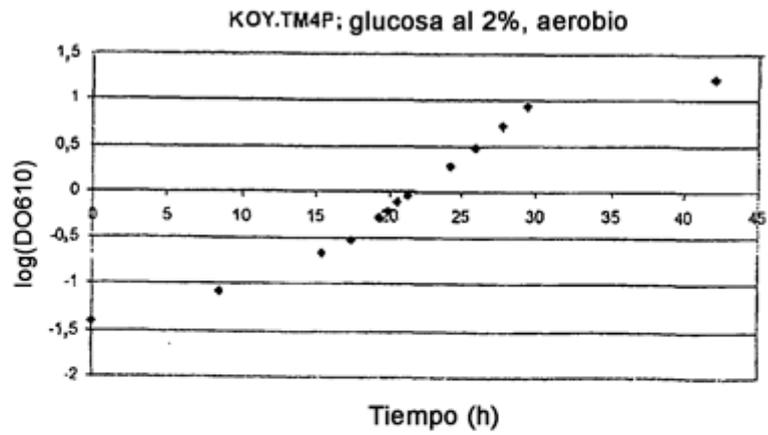


Figura 6

TM6; glucosa al 2%, aerobio

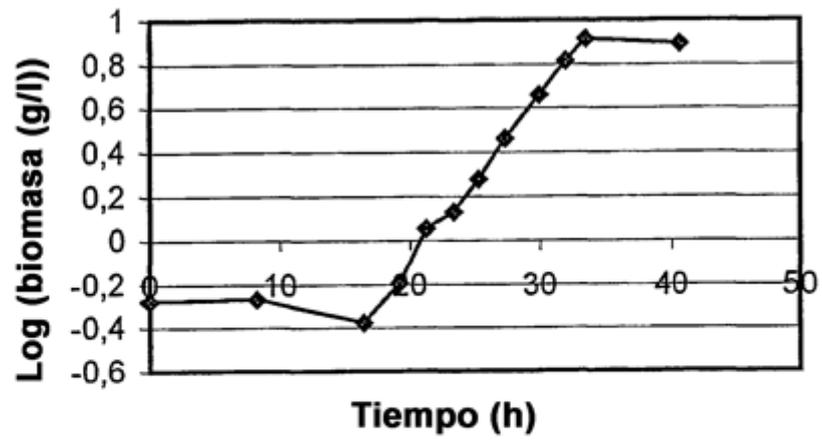


Figura 7A

TM4; glucosa al 2%, aerobio

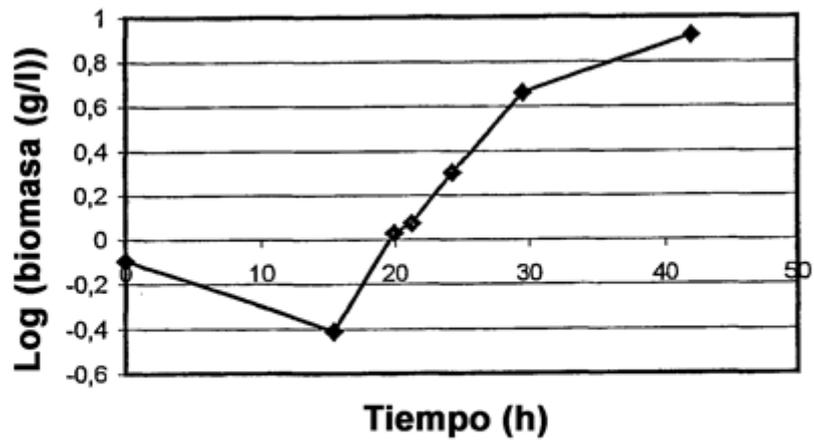


Figura 7B

Δ