

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 316**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2008 E 08843807 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2222860**

54 Título: **Método de modificación de una célula de levadura para la producción de etanol**

30 Prioridad:

29.10.2007 EP 07021129

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

12.11.2014

73 Titular/es:

**JACOBS UNIVERSITY BREMEN GMBH (100.0%)
Campus Ring 1
28759 Bremen, DE**

72 Inventor/es:

**NEVOIGT, ELKE;
GUILLOUET, STEPHANE;
BIDEAUX, CARINE;
ALFENORE, SANDRINE y
HUBMANN, GEORG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 521 316 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

Método de modificación de una célula de levadura para la producción de etanol

5 La invención se refiere a un método de modificación de una célula de levadura para la producción de etanol, a una célula de levadura modificada y a un uso de la misma para producir etanol. La invención se refiere además a un método para producir etanol a partir de biomasa.

10 El bioetanol es una alternativa prometedora a los combustibles fósiles. El creciente interés por los biocombustibles renovables resulta principalmente del hecho de que los combustibles fósiles en el mundo son limitados. Además, existe la tendencia a disminuir la dependencia de la importación de petróleo. La Comisión Europea ha planeado sustituir progresivamente el 20% de los combustibles fósiles convencionales por combustibles alternativos en el sector del transporte para el 2020 (el 5,75% para el 2010). Una ruta técnica es producir bioetanol mediante fermentación microbiana a partir de diversos cultivos domésticos (biomasa).

15 En Brasil y en los Estados Unidos es común la producción de bioetanol a partir de biomasa que contiene azúcar y almidón. La levadura *Saccharomyces (S.) cerevisiae* se ha usado tradicionalmente en este procedimiento. De hecho, la levadura *S. cerevisiae* tiene propiedades excepcionales para la producción de bioetanol. En particular, su alta tolerancia a las condiciones que se producen durante la producción de etanol industrial apenas permitirá que otros microorganismos desplacen a la levadura en este campo.

20 *S. cerevisiae* forma glicerol como subproducto durante el catabolismo de glucosa además de los productos de fermentación principales: etanol, dióxido de carbono y biomasa. El flujo de carbono hacia glicerol es bastante sustancial y puede ascender a hasta 0,1 g de glicerol por gramo de glucosa (Alfenore *et al.*, 2004; Aldiguiet *et al.*, 2004).

La biosíntesis de glicerol a partir del producto intermedio glicolítico dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en *S. cerevisiae* se realiza mediante dos etapas enzimáticas catalizadas por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) y la glicerol 3-fosfatasa (GPP) (véase también la figura 1). Cada enzima se codifica por dos isógenos *GPD1/GPD2* y *GPP1/GPP2*, respectivamente.

25 La biosíntesis de glicerol tiene papeles esenciales en *S. cerevisiae*. Una de las funciones más importantes es mantener un equilibrio redox citosólico, especialmente en condiciones anaerobias, y probablemente también en condiciones aerobias cuando la concentración de azúcar es alta (efecto Crabtree) (Ansell *et al.*, 1997; Bakker *et al.*, 2001; Rigoulet *et al.*, 2004; Valadi *et al.*, 2004). La ruta de biosíntesis de glicerol también está implicada en la biosíntesis de glicerofosfolípidos y triacilgliceroles que se forman a partir de L-glicerol 3-fosfato (Kohlwein *et al.*, 1996; Mullner y Daum, 2004). Además, el glicerol intracelular está implicado en osmoadaptación (Hohmann, 2002), protección frente a estrés oxidativo (Pahlman *et al.*, 2001) y respuesta a choque térmico (Siderius *et al.*, 2000). Respuestas a elevadas temperaturas y alta osmolaridad implican varias rutas de señalización incluyendo la ruta de proteína cinasa C y la ruta de HOG, que regulan los niveles intracelulares de glicerol (Hohmann, 2002; Wojda *et al.*, 2003).

35 En teoría, la redirección del flujo de carbono en *S. cerevisiae* hacia la ruta de síntesis de etanol eliminando la formación de glicerol podría aumentar el rendimiento de etanol en al menos un 10%. Además, una reducción del glicerol en el caldo de fermentación conduciría a una disminución en los costes de extracción de etanol, puesto que el glicerol ha provocado problemas en las unidades de destilación y procedimientos de separación tras la fase de fermentación. Además, se reducirían los volúmenes de residuos. Sin embargo, desde el punto de vista de los aspectos prácticos, reducir la formación de glicerol sin afectar negativamente a la aptitud biológica de las células es extremadamente desafiante debido a las diversas funciones biológicas de la ruta de biosíntesis de glicerol, tal como se explicará resumidamente ahora con referencia a estudios anteriores.

45 Hace pocos años, se notificó el primer enfoque de ingeniería metabólica para reducir el glicerol (Nissen *et al.*, 2000a). Se aumentó el rendimiento de etanol en fermentaciones discontinuas aerobias en un 12% cuando la formación de glicerol se suprimió completamente mediante la delección de *GPD1* y *GPD2*. El crecimiento de este mutante doble se veía gravemente afectado incluso en presencia de oxígeno. Por tanto, la productividad volumétrica de etanol obtenida con este enfoque distaba mucho de tener relevancia industrial. El hecho de que el crecimiento del mutante doble *gpd1Δ gpd2Δ* se viese afectado considerablemente, se ha explicado por una capacidad limitada de reoxidación de NADH respiratoria (mediante las NADH deshidrogenasas externas Nde1p, Nde2p y el transportador L-G3P/DHAP mitocondrial) (Nissen *et al.*, 2000a) que son las únicas rutas para reoxidar el exceso de NADH citosólico cuando GPD está ausente.

50 Otros intentos de reducir la formación de glicerol se basaron en la introducción de transhidrogenasas bacterianas en la levadura. Estos enfoques no funcionaron ya que, por un lado, la transhidrogenasa de *Azotobacter vinelandii* produjo el efecto opuesto al esperado (Nissen *et al.*, 2001), y por otro lado, la transhidrogenasa unida a membrana de *Escherichia coli* permaneció localizada en la membrana del retículo endoplásmico (Anderlund *et al.*, 1999).

Una estrategia bastante satisfactoria para mejorar el rendimiento de etanol ha sido la modificación mediante ingeniería metabólica de la asimilación de amonio, que reduce la producción de NADH durante la biosíntesis de

aminoácidos (Nissen *et al.*, 2000b). El rendimiento de glicerol se redujo en un 38% y el rendimiento de etanol aumentó en un 10%. Sin embargo, para una función apropiada, este enfoque requiere que la levadura utilice amonio como fuente de nitrógeno. Medios industriales contienen a menudo aminoácidos, un hecho que reducirá considerablemente el éxito de este enfoque en condiciones industriales pertinentes.

5 Recientemente, se llevó a cabo un estudio *in silico* usando un modelo metabólico de *S. cerevisiae* a escala de genoma con el fin de evaluar posibles estrategias de ingeniería metabólica para mejorar el rendimiento de etanol en *S. cerevisiae* (Bro *et al.*, 2005). Estos enfoques se han diseñado para impedir la producción de NADH en exceso a través de síntesis de biomasa, y por tanto, reducir la necesidad de producir glicerol. Basándose en las predicciones de los autores, varios enfoques deberían aumentar el rendimiento de etanol en hasta un 10,4%. Se sometió a prueba *in vivo* una de las estrategias predichas, pero a diferencia de la teoría, sólo dio como resultado un aumento del 3% del rendimiento de etanol.

Lin H. *et al.* han descrito el papel de fosfolipasa C para la expresión de Gpd 1 en *Saccharomyces cerevisiae* (Lin *et al.*, 2002).

15 Por tanto, los enfoques de ingeniería metabólica mencionados anteriormente no tienen o sólo tienen un impacto mínimo sobre la productividad de etanol en condiciones pertinentes a nivel industrial debido a las limitaciones en el rendimiento de etanol, crecimiento o dependencia del medio. Además, sigue siendo cuestionable si los enfoques actuales y predichos demostrarían ser satisfactorios a un estrés térmico y de etanol elevado de fermentaciones industriales, puesto que no tienen en cuenta la necesidad de las células de glicerol intracelular.

Descripción de la invención

20 Por tanto, el problema subyacente de la presente invención era aumentar el rendimiento de conversión de constituyentes de biomasa que puede fermentarse para dar etanol mediante levadura y, de hecho, aumentar la rentabilidad de plantas de bioetanol. Una manera de lograr este objetivo es reducir la producción del subproducto glicerol.

25 Un desafío particular en la resolución de este problema radica en el hecho de que se ha demostrado que la eliminación completa de la formación de glicerol no es satisfactoria, puesto que la ruta de biosíntesis de glicerol tiene varias funciones importantes para el crecimiento celular y la tolerancia al estrés.

30 En su lugar, los inventores encontraron sorprendentemente una estrategia para modificar una célula de levadura silvestre que conduce a un rendimiento aumentado de etanol a partir de azúcares, es decir azúcares que pueden fermentarse presentes en hidrolizados de biomasa vegetal, pero que al mismo tiempo no tiene una influencia negativa sobre la velocidad de crecimiento de las células de levadura o el rendimiento de biomasa. Según la invención, esto se consigue reduciendo (pero no eliminando) la actividad de la proteína Gpd1 y/o la proteína Gpd2 en comparación con la actividad de estas proteínas en una célula silvestre.

35 De hecho, a través de la invención se consigue un mayor rendimiento de etanol, título y productividad específica en comparación con la cepa silvestre isogénica. Además, la modificación de la ruta metabólica tiene la ventaja adicional de reducir los costes de la recuperación de productos y reduce los volúmenes de residuos.

40 La expresión "reduciendo la actividad" pretende no incluir la eliminación de la actividad de la proteína. Además, el término "actividad" se refiere al flujo metabólico *in vivo* a través de la proteína particular, que, según la definición de la expresión "reduciendo la actividad", no pretende incluir la obstrucción completa de este flujo metabólico. En su lugar, el quid de la invención radica en la reducción de la actividad de la proteína Gpd1 y/o la proteína Gpd2, pero proporcionando al mismo tiempo una actividad mínima de la proteína Gpd1 y/o la proteína Gpd2 con el fin de permitir la producción de sustancias posteriormente a estas enzimas (tal como glicerol) que son necesarias para mantener una velocidad de crecimiento normal.

45 Este resultado puede conseguirse de diferentes maneras: En primer lugar, es posible reducir la actividad de la proteína Gpd1 y eliminar la actividad de la proteína Gpd2. En segundo lugar, puede eliminarse la actividad de la proteína Gpd1 y puede reducirse la actividad de la proteína Gpd2. En tercer lugar, puede reducirse la actividad tanto de la proteína Gpd1 como de la proteína Gpd2. Un experto en la técnica puede determinar sin excesivos problemas cuál de las tres opciones conduce a los mejores resultados dependiendo, por ejemplo, del tipo de cepa de levadura usada o las condiciones de crecimiento.

50 Las células de levadura según la invención son útiles para cualquier aplicación en la que la producción de glicerol en la célula necesita minimizarse hasta un nivel que no influya negativamente en la velocidad de crecimiento de la célula.

La reducción de la actividad de la proteína Gpd1 y/o la proteína Gpd2 se consigue tal como sigue.

Se reduce la expresión del gen *GPD1* y/o el gen *GPD2*, lo que conduce a una reducción de la proteína en la célula.

Esto puede conseguirse en una realización de la invención expresando el gen *GPD1* y/o el gen *GPD2* mediante un

- 5 promotor débil que está ligado de manera funcional al gen *GPD1* y/o ligado de manera funcional al gen *GPD2*. Un promotor es débil cuando la tasa de transcripción del gen se reduce hasta al menos un 20% o un 15%, preferiblemente hasta al menos un 10%, lo más preferiblemente hasta al menos un 7% o un 5% de la tasa de transcripción de ese gen expresado en el promotor silvestre TEF1 (SEQ ID NO 11). Un experto en la técnica conoce maneras de medir la fuerza de un promotor, tales como el uso de un gen indicador como luciferasa o proteína verde fluorescente (GFP), medición de los niveles de ARNm, por ejemplo usando transferencia de tipo Northern o PCR con transcriptasa inversa en tiempo real; en el nivel de proteína mediante inmunotransferencia de tipo Western; o a través de mediciones de la actividad enzimática específica.
- 10 La expresión del gen *GPD1* y/o el gen *GPD2* se reduce en al menos un 50%, al menos un 60% o al menos un 70% en comparación con su expresión en una célula silvestre en su promotor silvestre. Es particularmente ventajoso reducir la expresión en al menos un 80% o al menos un 90%, y lo más preferido es reducir la expresión en al menos un 95% o al menos un 99%, en comparación con la expresión del gen particular en una célula de levadura silvestre, es decir una célula de levadura con un promotor nativo.
- 15 En una realización preferida, el promotor débil es un promotor según SEQ ID NO 5 ó 6. El promotor según SEQ ID NO 5 conduce a una tasa de transcripción del 7% y el promotor según SEQ ID NO 6 conduce a una tasa de transcripción del 16% de la tasa de transcripción provocada por el promotor silvestre TEF1 (SEQ ID NO 11) (Nevoigt *et al.*, 2006).
- 20 Las secuencias de aminoácidos de la proteína Gpd1, la proteína Gpd2, la proteína Gpp1 y la proteína Gpp2 de *S. cerevisiae* pueden encontrarse como SEQ ID NO 26, 27, 28 y 29, respectivamente. Un experto en la técnica puede identificar la secuencia de aminoácidos respectiva para otras especies de levadura.
- En una realización preferida del método según la invención, también se reduce la actividad de la proteína Gpp1 y/o la proteína Gpp2, es decir otra enzima clave de la ruta de glicerol, además de la reducción de la actividad de la proteína Gpd1 y/o la proteína Gpd2.
- 25 Es posible o bien reducir la actividad de la proteína Gpp1 y eliminar la actividad de la Gpp2, o bien eliminar la actividad de la proteína Gpp1 y reducir la actividad de la Gpp2 o bien reducir la actividad tanto de la proteína Gpp1 como de la Gpp2. Además, en una realización también es posible eliminar la actividad tanto de la proteína Gpp1 como de la Gpp2, tal como se mostrará en los ejemplos.
- 30 Los medios que pueden usarse para reducir la actividad de la proteína Gpd1 y/o la proteína Gpd2 son equivalentes a los medios explicados anteriormente y se aplican de un modo equivalente también para la reducción de la actividad de Gpp1 y/o Gpp2, tal como comprenderá un experto en la técnica. Por consiguiente, la actividad de GPP puede reducirse reduciendo la expresión de la proteína Gpp1 y/o la Gpp2, proporcionando una molécula antisentido al ARNm de *GPP1* (SEQ ID NO 3) y/o al de *GPP2* (SEQ ID NO 4), proporcionando un antagonista a la proteína Gpp1 y/o la Gpp2, proporcionando una forma mutada de la proteína Gpp1 y/o la proteína Gpp2 o proporcionando una molécula inhibidora pequeña tal como fluoruro, que se ha descrito como un inhibidor no específico de fosfatasas, para inhibir la proteína Gpp1 y/o la proteína Gpp2. Se hace referencia a la descripción facilitada anteriormente para detalles en cuanto a estos medios de reducción.
- 35 La presente invención puede usarse en general con cualquier cepa de levadura, tal como *S. cerevisiae* y especies estrechamente relacionadas (es decir otras especies del género *Saccharomyces*). También se prefieren otras especies de levadura distintas de *Saccharomyces*, especialmente aquellas que muestran fermentación etanólica y tienen la capacidad de fermentar pentosas tales como *Pichia (P.) stipitis*. Se prefiere particularmente el uso de cepas que son ventajosas en aplicaciones industriales, tales como la cepa de levadura *S. cerevisiae* prototrófica CEN.PK113-7D. Un experto en la técnica conoce otras cepas adecuadas.
- 40 Un experto en la técnica entenderá que cuando se usa una cepa diploide o poliploide, se vuelve necesario reducir las actividades de la Gpp1p y/o Gpp2p así como posiblemente Gpd1p y/o Gpd2p en todos los alelos presentes con el fin de conseguir la reducción necesaria en la actividad de las proteínas.
- 45 El problema subyacente también se soluciona mediante una célula de levadura modificada que puede obtenerse a través de un método tal como se describió anteriormente.
- 50 Específicamente, en una célula de levadura de este tipo, la actividad de la proteína Gpd1p y/o Gpd2p se reduce en comparación con la actividad de dichas proteínas en una célula de levadura silvestre, es decir en una célula de levadura con una actividad proteica normal (flujo normal) y una velocidad de crecimiento normal o, expresado de manera diferente, en comparación con una célula de levadura en la que no están presentes las modificaciones presentes en la célula de levadura modificada genéticamente según la invención que conducen a la actividad reducida de la proteína Gpd1 y/o Gpd2.
- Para la cantidad preferida de reducción de la actividad de las proteínas, se hace referencia a la descripción anterior.
- 55 Se describieron anteriormente medios para reducir la actividad de dichas proteínas, cuya aplicación conduce a una célula de levadura en la que

- se reduce la expresión del gen *GPD1* y/o gen *gpd2*.

Se describieron anteriormente características adicionales de una célula de levadura de este tipo según la invención, en relación con el método según la invención.

5 El problema subyacente también se soluciona a través del uso de una célula de levadura modificada genéticamente tal como se describió anteriormente, para producir etanol a partir de biomasa. Esto puede conseguirse proporcionando una célula de levadura modificada tal como se describió anteriormente, proporcionando biomasa y haciendo crecer la célula de levadura en presencia de la biomasa, así como obteniendo el etanol. En general, las células de levadura según la invención pueden usarse en cualquier aplicación en la que deba evitarse una alta producción de glicerol en la célula, ya que la reducción de glicerol según el método descrito en el presente documento no conduce a velocidades de crecimiento menores.

10 El término biomasa cuando se usa junto con un método de producción de etanol, pretende hacer referencia a materiales vegetales y derivados de plantas, tales como almidón, azúcar, celulosa, hemicelulosa, en particular de caña de azúcar, remolacha azucarera, maíz, cereales, etc.

15 El problema subyacente se soluciona además mediante un método para la producción de etanol que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una célula de levadura tal como se describió anteriormente,

- proporcionar biomasa, y

- hacer crecer la célula de levadura en presencia de la biomasa en condiciones que permiten la producción de etanol.

20 Tal como resultará evidente para un experto en la técnica, podría ser necesario o ventajoso tratar la biomasa química, enzimática o mecánicamente antes de hacer crecer la levadura junto con la biomasa, con el fin de facilitar la fermentación. Un experto en la técnica conoce métodos para tales tratamientos.

25 Tal como se mostró por Alfenore *et al.*, 2004, también puede reducirse la producción de glicerol adaptando las condiciones de crecimiento de la célula de levadura. Particularmente las condiciones de aireación y la composición del medio pueden tener una gran influencia sobre la producción de glicerol y por tanto sobre la producción de etanol.

Figuras

Figura 1

30 Se muestran las rutas implicadas en el metabolismo de glicerol en *Saccharomyces cerevisiae*. Se forma glicerol a partir de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) glicolítica mediante la acción tanto de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD codificada por *GPD1* y *GPD2*) como de glicerol 3-fosfatasa (G3Pasa codificada por *GPP1* y *GPP2*). Gut1p y Gut2p son responsables de la utilización de glicerol. Nevoigt y Stahl (1997) han revisado las rutas para la biosíntesis y metabolización de glicerol en *S. cerevisiae*. El canal Fps1p es el mediador de la mayor parte de la difusión pasiva de glicerol (Oliveira *et al.*, 2003). Las células de levadura captan el glicerol mediante el transportador Stt1p y probablemente también mediante Gup1p y Gup2p (Ferreira *et al.*, 2005). El glicerol se convierte en dihidroxiacetona (DHA) mediante glicerol deshidrogenasa (GDH) dependiente de NADP⁺. Se sugiere que los genes *ARA1*, *GCY1*, *GRE3*, *YPR1* contribuyen a esta actividad (Izawa *et al.*, 2004); sin embargo, otros notificaron que no se detecta ninguna actividad de esta enzima en absoluto, resultado que ha puesto en duda la relevancia de la ruta de DHA para *S. cerevisiae* (Norbeck y Blomberg, 1997). *DAK1* y *DAK2* codifican para dihidroxiacetona cinasa (Molin *et al.*, 2003). *NDE1* y *NDE2* codifican para la NADH deshidrogenasa externa en levadura que puede reoxidar directamente NADH citosólico transfiriendo los electrones a la cadena respiratoria. DHAP: dihidroxiacetona fosfato, GAP: gliceraldehído 3-fosfato, L-G3P: L-glicerol 3-fosfato, DHA: dihidroxiacetona, FBP: 1,6-fructosa bisfosfato y el *TPI1*: gen que codifica para triosa fosfato isomerasa.

Figura 2

45 La figura 2 muestra la alineación de secuencias del promotor *TEF1* no mutado de *Saccharomyces cerevisiae* y el mutante 2 del promotor *TEF1*. Se muestra la fuerza del promotor normalizada.

Figura 3

Actividad específica de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada mediante ingeniería relacionada con la silvestre isogénica. Se define 1 unidad como la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto y mg de proteína.

50 Figura 4

Rendimientos de etanol, biomasa y glicerol en gramos por glucosa consumida de la cepa de *Saccharomyces*

cerevisiae modificada mediante ingeniería y la silvestre isogénica tras un agotamiento de glucosa en fermentaciones de medio YEPD en condiciones limitadas de oxígeno.

Figura 5

5 Se muestra el resultado de un experimento de crecimiento de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada mediante ingeniería y la silvestre isogénica en un medio YEPD (placas de agar) en condiciones aerobias y anaerobias.

Figura 6

Se muestra el resultado de un experimento de crecimiento de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada mediante ingeniería y la silvestre isogénica en medio YEPD líquido en condiciones aerobias.

10 Figura 7

Producción de etanol, glicerol y consumo de azúcar tras una fermentación discontinua en condiciones limitadas de oxígeno a 30°C en malta de trigo. Se sacarificó completamente la malta de trigo y se centrifugó antes de que comenzara la fermentación. El hidrolizado contenía aproximadamente 143 g/l de azúcar total, es decir glucosa y fructosa. Se obtuvieron las condiciones limitadas de oxígeno cerrando los matraces Erlenmeyer con cierres tipo *airlock* que permitían la liberación de gases. Se llevó a cabo un mezclado usando un agitador magnético fijado a 200 rpm. Para este experimento, se usó la cepa de levadura *S. cerevisiae* prototrófica CEN.PK113-7D y un derivado con delección en *GPD2* y que porta modificaciones del promotor *GPD1* (una versión mutante del promotor TEF1 (promotor mutante 2, SEQ ID NO 5) y la secuencia loxP-KmR-loxP como marcador seleccionable). En esta cepa no se modificaron los genes que codificaban para GPP1 y GPP2.

20 En todos los paneles A a F de la figura 7, la barra izquierda muestra: CEN.PK113-7D, el 100% de actividad de GPD, y la barra derecha muestra: CEN.PK113-7D, el 6% de actividad de GPD.

El eje y de los paneles es como sigue:

7A Concentración de glicerol final (g/l)

7B Concentración de etanol final (g/l)

25 7C Rendimiento de glicerol (g/g de glucosa, fructosa consumida)

7D Rendimiento de etanol (g/g glucosa, fructosa consumida)

7E Razón: glicerol/etanol (g/g)

7F Azúcar (glucosa, fructosa) consumida (g/l)

Ejemplos

30 Material y métodos:

Medios:

Medio YEPD (el 1% extracto de levadura, el 2% de peptona, el 2% de glucosa)

Cepas de levadura:

35 Se originaron las cepas de levadura generadas en este estudio a partir de la cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* W303-1A (tabla 1). Se ha publicado la cepa YA103 correspondiente a una cepa con delección doble *gpp1Δ gpp2Δ* por Pahlman *et al.* (2001).

Modificaciones genéticas adicionales de la cepa de *S. cerevisiae* YA103:

1. Delección del gen *GPD2*/supresión de la expresión de *GPD2*

40 Se alteró el gen *GPD2* en la cepa YA103 mediante el método descrito por (Güldener *et al.*, 1996) usando pUG72 (Gueldener *et al.*, 2002) como molde y los cebadores P29 y P30 (tabla 2). Se controló la alteración de *GPD2* mediante PCR de diagnóstico usando el par de cebadores P33/P34 (tabla 2). Se llevó a cabo una selección de transformantes positivos sobre placas de agar que contenían medio CSM que carecía de uracilo. La cepa resultante se ha denominado EN-GGG (tabla 1).

2. Regulación por disminución de la expresión de *GPD1*

45 Se reemplazó el promotor *GPD1* cromosómico nativo en la cepa EN-GGG por el casete de reemplazo de promotor

5 amplificado a partir de ADN genómico de una cepa de levadura derivada de levadura de laboratorio BY4741 que portaba el promotor TEF mutado con la actividad más baja (Nevoigt *et al.*, 2006) en lugar del promotor *GPD1* nativo. Se usaron los cebadores P9 (SEQ ID NO 7) y P10 (SEQ ID NO 8) para una amplificación por PCR del casete de reemplazo de promotor (incluyendo la secuencia *loxP-K.I.LEU2-loxP* como marcador seleccionable). Las condiciones de PCR eran tal como se publicaron anteriormente (Nevoigt *et al.*, 2006). Se combinaron dos alícuotas de PCR de 100 µl, se precipitaron y se usaron para una transformación tal como se describe por Güldener *et al.* (1996). Se llevó a cabo una selección de transformantes positivos sobre placas de agar que contenían medio CSM que carecía de leucina.

10 Se comprobó la integración correcta del casete de reemplazo de promotor mediante PCR de diagnóstico usando una combinación de cebadores P9 (SEQ ID NO 7)/P12 (SEQ ID NO 10) y P11 (SEQ ID NO 9)/P12 (SEQ ID NO 10) (tabla 2). La cepa resultante se ha denominado EN-G46a (tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* usadas en los ejemplos

Cepa	Genotipo	Referencia
W303-1A*	<i>MATa</i>	Thomas y Rothstein (1989)
YA103*	<i>MATa gpp1Δ::kanMX4 gpp2Δ::HIS3</i>	Påhlman <i>et al.</i> (2001)
EN-GGG*	<i>MATa gpp1Δ::kanMX4 gpp2Δ::HIS3 gpd2Δ::K.I.URA3</i>	
EN-G46a*	<i>MATa gpp1Δ::kanMX4 gpp2Δ::HIS3 gpd2Δ::K.I.URA3 gpd1p::TEFmut2::K.I.LEU2</i>	

* Estas cepas albergan mutaciones adicionales tal como sigue: *leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal0*

Tabla 2. Cebadores usados

Uso/nombre	Secuencia	SEQ ID NO
Amplificación del casete de reemplazo de promotor incluyendo la versión mutante del promotor TEF1 (promotor mutante 2 descrito en Nevoigt <i>et al.</i>, 2006) y la secuencia <i>loxP-K. I. LEU2-loxP</i> como marcador seleccionable:		
P9 (se une al prom. <i>GPD1</i> en el sentido de 5')	cccaaggcaggacagttacc	SEQ ID NO 7
P10 (se une en la sec. cod. de <i>GPD1</i>)	agcaccagatagagcaccaca	SEQ ID NO 8
PCR de diagnóstico para comprobar la integración correcta del casete de reemplazo de promotor:		
P11 (se une en <i>K.I.LEU2</i>)	ggaccaccaacagcacctagt	SEQ ID NO 9
P12 (se une al sitio de integración en el sentido de 3' en la secuencia codificante de <i>GPD1</i>)	gtaagcaactgttgttcaga	SEQ ID NO 10
Delección de <i>GPD2</i> usando <i>loxP-K.I. URA3-loxP</i> como marcador seleccionable:		
P29	atgcttgctgcagaagattaacaagatacacattccttagatccaatacaacagatcagc	SEQ ID NO 12
P30	cgatgtctagctctcaatcatctccgtaggttctccatgtttatttaggtctatcg	SEQ ID NO 13
PCR de diagnóstico para controlar la alteración de <i>GPD2</i>:		
P33	ggtagattcaattcttctccc	SEQ ID NO 14
P34	aggcaacaggaaagatcagagg	SEQ ID NO 15

Fermentaciones discontinuas con oxígeno limitado y determinación de rendimientos de productos

- 15 1^{er} día:
- 1^{er} precultivo: inocular 20 ml de YEPD con 500 µl de disolución madre de glicerol
 - Incubar durante la noche a 30°C en un agitador (170 rpm) durante 20 horas
- 2^o día:
- 2^o precultivo: inocular 150 ml de YEPD con 1,5 ml del primer precultivo
- 20 - Incubar durante la noche a 30°C en un agitador (170 rpm) durante 20 horas
- 3^{er} día:

- Centrifugar el 2^o precultivo (10 min, 5000 rpm, 4°C) y lavar las células una vez con agua destilada
 - Inoculación del cultivo principal: inocular 100 ml de YEPD en matraces Schott de 100 ml ajustando una DO de 0,2
 - Inmediatamente, se tomaron muestras para la determinación de las concentraciones iniciales de glicerol, etanol, glucosa y biomasa
- 5 - Añadir un agitador magnético y cerrar los matraces con cierres tipo *airlock* para garantizar una liberación de gases pero impedir la entrada de oxígeno
- Agitar el cultivo durante 24 h a 28°C y 300 rpm

4^o día:

- 10 - Se tomaron muestras (2 x 1 ml), se centrifugaron (10 min, 12000 rpm, 4°C) y se almacenaron los sobrenadantes a -20°C hasta que se midieron las concentraciones de glicerol, etanol y glucosa. Se llevaron a cabo las mediciones de glucosa y productos de fermentación tal como se describió anteriormente (Nevoigt y Stahl, 1996). Se determinó el peso seco de levadura (biomasa) al final de la fermentación filtrando 30 ml del cultivo usando filtros de nitrocelulosa pesados previamente (tamaño de poro de 0,45 mm). Se lavaron los filtros con las células con agua destilada y se secaron hasta que el peso alcanzó un valor estable.

- 15 Determinación de la actividad específica de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa

En general, se determinaron actividades enzimáticas *in vitro* durante el crecimiento logarítmico, es decir cuando la densidad celular era aproximadamente 1 durante las fermentaciones discontinuas. Se rompieron células de levadura mediante agitación con vórtices con perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) durante 15 min a 4°C según un método descrito previamente (Ciriacy, 1975). Con el fin de someter a ensayo GPD, se recogieron aproximadamente 3×10^9 células y se homogeneizaron en 3 ml de tampón trietanolamina (Blomberg y Adler, 1989; Andre *et al.*, 1991) que contenía 0,2 mmol/l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 2 g de perlas de vidrio. Se centrifugó el homogeneizado en cada caso a 12000 g y 4°C durante 15 min. Se usó el sobrenadante tras la desalación mediante paso a través de una columna Sephadex G-25. (Farmacia PD-10, Farmacia Fine Chemicals, Suecia). Se sometió a ensayo GPD en tampón imidazol a pH 7,0 según Gancedo *et al.* (1968). Se midió la concentración de proteínas mediante el método con azul de Coomassie (Bradford, 1976), usando albúmina sérica bovina A 3350 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) como patrón (Nevoigt y Stahl, 1996).

Crecimiento sobre placas de agar en condiciones aerobias y anaerobias

- 30 Se diluyeron cultivos de fase estacionaria de las dos cepas en medio YEPD (diluciones de diez veces) y se transfirió una alícuota a placas de agar con YEPD usando un sello. Se incubaron las placas durante 3 días. Se obtuvieron condiciones libres de oxígeno aplicando Anaerocult A (MERCK) en un incubador hermético.

Deleciones de *GPP1* y *GPP2*

Puede efectuarse deleción del gen *GPP1* mediante la técnica de selección como diana mediante PCR de regiones de homología flanqueantes largas (Pahlman *et al.*, 2001). En la primera etapa, se usaron un conjunto de cebadores (TGTTGTGAGTTCCTCTTTTCTT (SEQ ID NO 16) y TCAAAGGCATTGCGATGGTT (SEQ ID NO 17)) para amplificar una porción de 263 pares de bases (pb) de longitud de ADN genómico de *S. cerevisiae* W303, en el sentido de 5' del tercer codón en el ORF de *GPP1*. Se usó un segundo conjunto (CGCTAAGGATGACTTGTTGA (SEQ ID NO 18) y CTCTAATTCTCGTCTGACT (SEQ ID NO 19)) para amplificar un fragmento de 358 pb del noveno codón en el ORF de *GPP1* en el sentido de 5' del codón de terminación. El extremo 59 de los cebadores adyacentes al sitio de inserción portaba 25 extensiones de nucleótidos homólogas a las regiones 59 y 39 del casete de alteración *hisGMX6* o *kanMX4* de los plásmidos pFA6a-*hisGMX6* y pFA6-*kanMX4*. En la segunda reacción PCR, se usaron pFA6a-*hisGMX6* y pFA6-*kanMX4* como moldes y se fusionaron las regiones homólogas a 59 y 39 de la primera reacción PCR al casete de alteración sirviendo como cebadores junto con los cebadores directo en el sentido de 5' e inverso en el sentido de 3' de las regiones flanqueantes, produciendo así el casete de selección como diana del ORF. Se transformó este casete en una cepa W303 de *S. cerevisiae* haploide, y se seleccionaron transformantes independientes para la verificación del reemplazo de *GPP1*. Usando un conjunto de cebadores (directo: CAAGCAGGAAATCCGATCA (SEQ ID NO 20) e inverso TCATATGGAGCAATCCCACT (SEQ ID NO 21)) que se hibridaban en el sentido de 5' y en el sentido de 3', respectivamente, del casete de disrupción, se amplificó ADN cromosómico. Se verificó la longitud de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Se alteró el ORF de *GPP2* de una manera similar usando un conjunto de cebadores (CAAGTGAGGACTTTTCGGAT (SEQ ID NO 22) y GTAGTCAATCCCATCCGAA (SEQ ID NO 23)) para amplificar un fragmento de 346 pb en el sentido de 5' del cuarto codón en el ORF. Se usó el segundo conjunto (GGACGATCTGTTGAAATGGT (SEQ ID NO 24) y CCTGTCCACTTTCAAGTTGCT (SEQ ID NO 25)) para amplificar un fragmento de 287 pb del séptimo codón en el ORF de *GPP2* en el sentido de 3' del codón de terminación. Se verificó la integración correcta de los módulos de alteración en los alelos de *GPP1* y *GPP2* mediante PCR usando cebadores apropiados.

- 55 Basándose en esta cepa, se introdujeron deleciones adicionales tal como se describe en el presente documento.

Experimentos preliminares

En estudios iniciales, los inventores sometieron a prueba cepas con deleciones en GPP para determinar su capacidad de impedir la formación de glicerol en la producción de bioetanol combustible. La eliminación completa de GPD, una enzima clave en la biosíntesis de glicerol, no era sencilla. Se han observado las ventajas principales de la supresión de la actividad de GPP, en lugar de GPD, en i) la conservación de la etapa de reoxidación de NADH de la biosíntesis de glicerol (realizada mediante productos génicos de *GPD1/2*) y ii) la provisión de L-G3P con fines anabólicos (figura 1).

Se estudiaron tanto cepas con deleción individual (*gpp1Δ* y *gpp2Δ*) como una cepa con deleción doble (*gpp1Δgpp2Δ*) de la cepa de levadura de laboratorio W301-1A. Se caracterizaron los fenotipos de las diferentes cepas durante procedimientos de fermentación de etanol dinámica en un biorreactor altamente dotado de instrumentos de medida en un medio mineral en condiciones aerobias. Un análisis comparativo de la cepa silvestre y las diferentes cepas mutantes condujo a las siguientes conclusiones:

- una deleción individual de uno de los dos genes *GPP* no condujo a cambios fenotípicos importantes (crecimiento, producción de etanol y glicerol)

- sólo se disminuyó la concentración de glicerol en un 65% en el mutante con deleción doble *gpp1Δ gpp2Δ* pero no se suprimió

- el mutante doble *gpp1Δ gpp2Δ* mostró una velocidad de crecimiento que se vio afectada negativamente (disminuida en un 65%) y una menor tolerancia al etanol

Se desconoce la ruta de formación de glicerol en un mutante *gpp1Δ gpp2Δ*. Además, los motivos del crecimiento que se vio afectado negativamente y la menor tolerancia al etanol en el mutante con deleción doble *gpp1Δ gpp2Δ* siguen siendo poco claros. No obstante, los datos muestran que una deleción completa de GPP tampoco es sencilla para mejorar considerablemente la productividad de etanol. Probablemente GPP tiene otra función que se desconoce pero importante en la célula.

Los experimentos muestran que puede recuperarse el crecimiento de un mutante *gpp1Δ gpp2Δ* a nivel silvestre tras reducir la actividad de GPD en esta cepa. Por tanto, se supone, sin querer restringirse a la teoría, que una alta acumulación intracelular de L-glicerol 3-fosfato es responsable del defecto de crecimiento de un mutante *gpp1Δ gpp2Δ*. Se reduce este alto nivel cuando se reduce la actividad de GPD en la célula.

Por tanto, los inventores encontraron sorprendentemente que se mantiene una aptitud biológica celular (en GPP silvestre) o se restablece (en células con actividad de GPP suprimida) si no se suprime completamente la actividad de GPD, una enzima clave en la ruta de biosíntesis de glicerol, pero que en su lugar se mantiene un flujo mínimo a través de la enzima clave requerido por la célula. Esto está en contraposición con una supresión completa de GPD o GPP, puesto que ambas demostraron ser perjudiciales para la aptitud biológica celular.

Generación de promotores de actividades clasificadas para ajustar de manera precisa actividades enzimáticas

Es de crucial importancia tener herramientas para ajustar de manera precisa actividades enzimáticas con el fin de determinar los requisitos mínimos de las células con respecto al flujo a través de la ruta de biosíntesis de glicerol. Recientemente, se desarrolló una colección robusta y bien caracterizada de mutantes de promotor de levadura de fuerzas clasificadas de manera precisa (Alper *et al.*, 2005; Nevoigt *et al.*, 2006). Usando estos mutantes de promotor, se crearon casetes de reemplazo de promotor, que ahora están disponibles en combinación con dos marcadores seleccionables genéticamente diferentes. Para mostrar la utilidad de estos casetes de promotor, se han usado para ajustar la expresión de *GPD1* en *S. cerevisiae* y analizar el impacto sobre la formación de glicerol y el rendimiento de biomasa (Nevoigt *et al.*, 2006).

Resultados

Se generó una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* que portaba deleciones en los genes *GPP1*, *GPP2* y *GPD2* y que tenía una expresión muy baja de *GPD1* debido al hecho de que el promotor *GPD1* nativo en el genoma de levadura se reemplazó por un promotor débil. Este promotor débil (SEQ ID NO 5) se obtuvo de la colección de mutantes del promotor *TEF1* (mutante 2 TEFp) creada por Nevoigt *et al.* (2007) y se muestra junto con el promotor silvestre *TEF1* (SEQ ID NO 11) en la figura 2.

Esta cepa denominada *gpp1Δ gpp2Δ gpd2Δ TEF1pmut2-GPD1* (EN-G46a; tabla 1) mostró una actividad de GPD que era aproximadamente el 7% de la de la silvestre isogénica (figura 3). La cepa *gpp1Δ gpp2Δ gpd2Δ TEF1pmut2-GPD1* y la silvestre correspondiente se usaron para fermentar el 2% de glucosa en un medio complejo (YEED) en condiciones limitantes de oxígeno (véanse los métodos anteriores). La cepa modificada mediante ingeniería mostró un rendimiento de glicerol por gramo de glucosa consumida que era sólo el 14,5% del de la silvestre (figura 4). El rendimiento de etanol (gramos de etanol por gramo de glucosa consumida) era un 6,7% mayor que el rendimiento de la silvestre (figura 4). Sorprendentemente, el rendimiento de biomasa final (figura 4) no se vio influido por la modificación mediante ingeniería de la ruta de glicerol aún cuando las condiciones durante la fermentación

5 discontinua eran casi anaerobias (100 ml de cultivo en matraces de 100 ml cerrados con cierres tipo *airlock*). También se investigó el crecimiento de ambas cepas en condiciones aerobias y anaerobias usando placas de agar con YEPD y prácticamente no hubo ninguna diferencia (figura 5). También se mostró que el crecimiento en el medio YEPD líquido en condiciones aerobias era el mismo (figura 6). Ambas cepas mostraron una velocidad de crecimiento promedio de $0,27 \text{ h}^{-1}$ durante la fase de crecimiento exponencial.

Experimentos preliminares han mostrado que puede obtenerse el mismo resultado regulando por disminución la actividad de GPD sola, es decir sin delecciones de *GPP1* y *GPP2*. Por tanto, parece que las delecciones de *GPP1* y *GPP2* no son necesarias para la invención.

Relevancia industrial de los resultados

10 Los resultados obtenidos tienen un gran impacto sobre la producción de bioetanol (incluyendo biocombustibles de primera generación) puesto que puede producirse más etanol a partir de la misma cantidad de sustrato (hidratos de carbono tales como hidrolizados de almidón, celulosa o hemicelulosa). Además, se reduce considerablemente la producción de glicerol. Esto también es importante porque el glicerol participa en la incrustación de las unidades de destilación en el procedimiento de producción de bioetanol.

15 Ésta es la primera vez que se redujo considerablemente la producción de glicerol sin influir negativamente en el crecimiento en condiciones limitantes de oxígeno. El aumento en la productividad de etanol es mayor que el descrito en la técnica anterior debido a la velocidad de crecimiento normal de las células junto con una producción aumentada de etanol a expensas de la formación de glicerol.

Bibliografía

- 20 • Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J. L., Goma, G., Molina-Jouve, C. y Guillouet, S. E. (2004). Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl Microbiol Biotechnol* 63, 537-42.
- Alper, H., Fischer, C., Nevoigt, E. y Stephanopoulos, G. (2005). Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12678-83.
- 25 • Anderlund, M., Nissen, T. L., Nielsen, J., Villadsen, J., Rydstrom, J., Hahn-Hagerdal, B. y Kielland-Brandt, M. C. (1999). Expression of the *Escherichia coli* *pntA* and *pntB* genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation. *Appl Environ Microbiol* 65, 2333-40.
- 30 • Andre L, Hemming A, Adler L. 1991. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett* 286 (1-2): 13-7.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M. y Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *Embo J* 16, 2179-87.
- 35 • Bakker, B. M., Overkamp, K. M., van Maris, A. J., Kotter, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 25, 15-37.
- Blomberg A, Adler L. 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171 (2), 1087-92.
- 40 • Bothast, R. J. y Schlicher, M. A. (2005). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 19-25.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Bro, C., Regenberg, B., Forster, J. y Nielsen, J. (2005). In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab Eng*.
- 45 • Ciriacy M. 1975. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Mol Gen Genet* 138 (2), 157-64.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., Lucas, C. y Brandt, A. (2005). A member of the sugar transporter family, *Stl1p* is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16, 2068-76.
- 50 • Gancedo C, Gancedo JM, Sols A. 1968. Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *Eur J Biochem* 5 (2), 165-72.

- Granath K, Modig T, Forsmark A, Adler L, Lidén G. (2005) The YIG1 (YPL201c) encoded protein is involved in regulating anaerobic glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22 (16), 1257-68.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. y Hegemann, J. H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30, e23.
- 5 • Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. y Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24, 2519-24.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 300-72.
- Izawa, S., Sato, M., Yokoigawa, K. e Inoue, Y. (2004). Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 108-14.
- 10 • Jeffries, T. W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 17, 320-6.
- Karhumaa, K., Wiedemann, B., Hahn-Hagerdal, B., Boles, E. y Gorwa-Grauslund, M. F. (2006). Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microb Cell Fact* 5, 18.
- Kohlwein, S. D., Daum, G., Schneider, R. y Paltauf, F. (1996). Phospholipids: synthesis, sorting, subcellular traffic - the yeast approach. *Trends Cell Biol* 6, 260-6.
- 15 • Lin, Y. y Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69, 627-42.
- Lynd, L. R., van Zyl, W. H., McBride, J. E. y Laser, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol* 16, 577-83.
- 20 • Molin, M., Norbeck, J. y Blomberg, A. (2003). Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone. *J Biol Chem* 278, 1415-23.
- Mullner, H. y Daum, G. (2004). Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim Pol* 51, 323-47.
- Nevoigt, E., Fischer, C., Mucha, O., Matthaus, F., Stahl, U. y Stephanopoulos, G. (2007). Engineering promoter regulation. *Biotechnol Bioeng* 96, 550-8.
- 25 • Nevoigt, E., Kohnke, J., Fischer, C. R., Alper, H., Stahl, U. y Stephanopoulos, G. (2006). Engineering of Promoter Replacement Cassettes for Fine-Tuning of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 72, 5266-73.
- Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, E., Schmidt, U., Freihammer, S., Eschenbrenner, M., Garbe, L. y Stahl, U. (2002). Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Res* 2, 225-32.
- 30 • Nevoigt, E. y Stahl, U. (1996). Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD⁺] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1331-7.
- Nevoigt, E. y Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 21, 231-41.
- 35 • Nguyen, H. T., Dieterich, A., Athenstaedt, K., Truong, N. H., Stahl, U. y Nevoigt, E. (2004). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of L-glycerol 3-phosphate. *Metab Eng* 6, 155-63.
- Nissen, T. L., Anderlund, M., Nielsen, J., Villadsen, J. y Kielland-Brandt, M. C. (2001). Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast* 18, 19-32.
- 40 • Nissen, T. L., Hamann, C. W., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J. y Villadsen, J. (2000a). Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast* 16, 463-74.
- Nissen, T. L., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J. y Villadsen, J. (2000b). Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metab Eng* 2, 69-77.
- Norbeck, J. y Blomberg, A. (1997). Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1,4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J Biol Chem* 272, 5544-54.
- 45 • Oliveira, R, Lages, F., Silva-Graca, M. y Lucas, C. (2003). Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochim Biophys Acta* 1613, 57-71.

- Pahlman, A. K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S. y Adler, L. (2001). The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* 276, 3555-63.
- 5 • Rigoulet, M., Aguilaniu, H., Averet, N., Bunoust, O., Camougrand, N., Grandier-Vazeille, X., Larsson, C., Pahlman, I. L., Manon, S. y Gustafsson, L. (2004). Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* 256-257, 73-81.
- Siderius, M., Van Wuytswinkel, O., Reijenga, K. A., Kelders, M. y Mager, W. H. (2000). The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol Microbiol* 36, 1381-90.
- 10 • Valadi, A., Granath, K., Gustafsson, L. y Adler, L. (2004). Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J Biol Chem* 279, 39677-85.
- Wojda, L., Alonso-Monge, R., Bebelman, J. P., Mager, W. H. y Siderius, M. (2003). Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology* 149, 1193-204.
- 15 • Lin H. *et al.* (2002). Phospholipase C interacts with Sgd1p and is required for expression of GDP1 and osmoresistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *MGG Molecular Genetics and Genomics*, vol. 267, n.º 3, 313-320

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Technische Universität Berlin
- 20
- <120> Método de modificación de una célula de levadura para la producción de etanol
- <130> U60040PCT
- 25 <150> EP 07021129.7
- <151> 29-10-2007
- <160> 29
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 2176
- <212> ADN
- 35 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
- <400> 1

ES 2 521 316 T3

aaaaaaagaa gaaaacagaa ggccaagaca gggccaatga gactggtgtc ctectactgt	60
ccctatgtct ctggccgac acgcgccatt gtccctcaga aacaaatcaa acaccacac	120
cccgggcacc caaagtcccc acccacacca ccaatacgt aacggggcgc cccctgcagg	180
ccctcctgcg cgcggcctcc cgccttgctt ctctcccctt ccttttcttt ttccagtttt	240
ccctattttg tcccttttcc cgcacaacaa gtatcagaat gggttcatca aatctatcca	300
acctaattcg cacgtagact ggcttggtat tggcagtttc gtagttatat atatactacc	360
atgagtgaag ctggtacgctt accttaaatt cttctcccct ttaatcttct tttatcttac	420
tctcctacat aagacatcaa gaaacaattg tatattgtac accccccccc tccacaaaca	480
caaatattga taatataaag atgtctgctg ctgctgatag attaaactta acttccggcc	540
acttgaatgc tggtagaaag agaagttcct cttctgtttc tttgaaggct gccgaaaagc	600
ctttcaaggt tactgtgatt ggatctggta actggggtac tactattgcc aaggtggttg	660
ccgaaaattg taagggatac ccagaagttt tcgctccaat agtacaaatg tgggtggtcg	720
aagaagagat caatggtgaa aaattgactg aatcataaa tactagacat caaaactga	780
aatacttgcc tggcatcact ctaccgcaca atttggttgc taatccagac ttgattgatt	840
cagtcaagga tgtcgacatc atcgttttca acattccaca tcaatctttg ccccgatatc	900
gtagccaatt gaaaggtcat gttgattcac acgtcagagc tatctcctgt ctaaagggtt	960
ttgaagttgg tgctaaaggt gtccaattgc tatectctta catcactgag gaactaggta	1020
ttcaatgtgg tgctctatct ggtgctaaca ttgccaccga agtcgctcaa gaacactggt	1080

ES 2 521 316 T3

ctgaaacaac agttgcttac cacattccaa aggatttcag aggcgagggc aaggacgtcg 1140
 accataaggt tctaaaggcc ttgttcaca gaccttactt ccacgttagt gtcatcgaag 1200
 atgttgctgg tatctccatc tgtgggtgctt tgaagaacgt tgttgcctta ggttgtgggt 1260
 tcgtcgaagg tctaggctgg ggtaacaacg cttctgctgc catccaaaga gtcggtttgg 1320
 gtgagatcat cagattcgggt caaatgtttt tcccagaatc tagagaagaa acatactacc 1380
 aagagtctgc tgggtgttgc gatttgatca ccacctgcgc tgggtggtaga aacgtcaagg 1440
 ttgctaggct aatggctact tctggtaagg acgcctggga atgtgaaaag gagttgttga 1500
 atggccaatc cgctcaaggt ttaattacct gcaaagaagt tcacgaatgg ttggaaacat 1560
 gtggctctgt cgaagacttc ccattatttg aagccgtata ccaaatcgtt tacaacaact 1620
 acccaatgaa gaacctgccg gacatgattg aagaattaga tctacatgaa gattagattt 1680
 attggagaaa gataacatat catactttcc cccacttttt tcgaggctct tctatatcat 1740
 attcataaat tagcattatg tcattttctca taactacttt atcacgtagg aaattactta 1800
 ttattattaa attaatacaa aatttagtaa ccaaataaat ataaataaat atgtatattt 1860
 aaattttaaa aaaaaaatcc tatagagcaa aaggattttc cattataata ttagctgtac 1920
 acctcttccg cattttttga ggggtggttac aacaccactc attcagaggc tgcgggcaca 1980
 gttgcttcta gcatctggcg tccgtatgta tgggtgtatt ttaaataata aacaaagtgc 2040
 cacacctca ccaattatgt cttaagaaa tggacaagtt ccaaagagct tgcccaaggc 2100
 tcgacaagga tgtactttgg aatatctata ttcaagtacg tggcgcgcat atgtttgagt 2160
 gtgcacacaa taaagg 2176

<210> 2

<211> 2323

<212> ADN

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

cttagcctct agccatagcc atcatgcaag cgtgtatctt ctaagattca gtcacatca 60
 ttaccgagtt tgttttcctt cacatgatga agaaggtttg agtatgctcg aaacaataag 120
 acgacgatgg ctctgccatt gttatattac gcttttgcgg cgagggtgccg atggggttgc 180
 gaggggaaga gtgttttagct taoggaceta ttgccattgt tattocgatt aatctattgt 240
 tcagcagctc ttctctaccc tgtcatteta gtattttttt tttttttttt tggtttttact 300

tttttttctt cttgcctttt ttctttggtt ctttttttct agtttttttt ccttccacta 360
 agctttttcc ttgatttatc cttgggttct tctttctact ccttttagatt ttttttttat 420
 atattaattt ttaagtttat gtattttggt agattcaatt ctctttccct ttccctttcc 480
 ttgcctcccc ttccttatca atgcttgctg tcagaagatt aacaagatac acattcctta 540
 agcgaacgca tccgggtgta tatactcgtc gtgcatataa aattttgcct tcaagatcta 600
 ctttcctaag aagatcatta ttacaaacac aactgcactc aaagatgact gctcatacta 660
 atatcaaaca gcacaaacac tgtcatgagg accatcctat cagaagatcg gactctgcog 720
 tgtcaattgt acatttgaaa cgtgcggcct tcaaggttac agtgattggt tctggtaact 780
 gggggaccac catcgccaaa gtcattgcgg aaaacacaga attgcattcc catatcttcg 840
 agccagaggt gagaatgtgg gtttttgatg aaaagatcgg cgacgaaaat ctgacggata 900
 tcataaatac aagacaccag aacgttaa atctaccaa tattgacctg ccccataatc 960
 tagtggccga tccctgatctt ttacactcca tcaagggtgc tgacatcctt gttttcaaca 1020
 tccctcatca atttttacca aacatagtca aacaattgca aggccacgtg gccctcatg 1080
 taagggccat ctctgtgcta aaagggttcg agttgggctc caagggtgtg caattgctat 1140
 cctcctatgt tactgatgag ttaggaatcc aatgtggcgc actatctggt gcaaacttgg 1200
 caccggaagt ggccaaggag cattggtccg aaaccaccgt ggcttaccaa ctaccaagg 1260
 attatcaagg tgatggcaag gatgtagatc ataagatttt gaaattgctg ttccacagac 1320
 cttacttcca cgtcaatgtc atcgatgatg ttgctggtat atccattgcc ggtgccttga 1380
 agaacgtcgt ggcacttgca tgtggtttcg tagaaggat gggatgggggt aacaatgcct 1440
 ccgcagccat tcaaaggctg ggtttaggtg aaattatcaa gttcggtaga atgtttttcc 1500
 cagaatccaa agtcgagacc tactatcaag aatccgctgg tgttgcagat ctgatcacca 1560
 cctgctcagg cggtagaaac gtcaaggttg ccacatacat ggccaagacc ggtaagtcag 1620
 ccttgaagc agaaaaggaa ttgcttaacg gtcaatccgc ccaagggata atcacatgca 1680
 gagaagtca cgagtggcta caaacatgtg agttgacca agaattccca ttattcgagg 1740
 cagtctacca gatagtctac aacaacgtcc gcatggaaga cctaccggag atgattgaag 1800
 agctagacat cgatgacgaa tagacactct cccccccct cccctctga tctttcctgt 1860
 tgcctctttt tcccccaacc aatttatcat tatacacaag ttctacaact actactagta 1920
 acattactac agttattata attttctatt ctctttttct ttaagaatct atcattaacg 1980

ES 2 521 316 T3

ttaatttcta tatatacata actaccatta tacacgctat tategtttac atatcacatc 2040
accgttaatg aaagatacga caccctgtac actaacacaa ttaaataatc gccataacct 2100
tttctgttat ctatagccct taaagetggt tcttcgagct ttttcaactgc agtaattctc 2160
cacatgggccc cagccactga gataagagcg ctatgtagt cactactgac ggctctccag 2220
tcatttatgt gatttttttag tgactcatgt cgcatttggc cegttttttt cegctgtcgc 2280
aacctatttc cattaacggt gccgtatgga agagtcattt aaa 2323

<210> 3

<211> 1753

<212> ADN

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

ggaaatccgt atcattttct cgcatacacg aaccgcgctg cgcttggtaa attgcaggat 60
tctcattgtc cggttttctt tatgggaata atcatcatca ccattatcac tgttactctt 120
gcatcatca tcattaacat aattttttta acgctgtttg atgatggtat gtgcttttat 180
tgttccttac tcacctttc ctttgtgtct ttaattttg accattttga ccattttgac 240
ctttgatgat gtgtgagttc ctcttttctt tttttctttt cttttttcct tttttttct 300
tttcttactc tgtaaatcac tttctttcct ttttgttcat attgtcgtct tgttcatttt 360
cgttcaattg ataatgtata taaatcttc gtaagtatct cttgattgcc atttttttct 420
ttccaagttt ccttgttatg aaacgtttca atgttttaaa atatatcaga acaacaaaag 480
caaatataca aaccatcgca atgccttga ccacaaaacc tttatctttg aaaatcaacg 540
ccgctctatt cgatggtgac ggtaccatca tcctctctca accagocatt gctgctttct 600
ggagagattt cggtaaagac aagccttact tcgatgocga acacgttatt cacatctctc 660
acggttgag aacttacgat gccattgcca agttoctcc agactttgct gatgaagaat 720
acgttaacaa gctagaaggt gaaatcccag aaaagtacgg tgaacactcc atcgaagttc 780
caggtgctgt caagttgtgt aatgcttga acgccttgcc aaaggaaaa tgggctgtcg 840
ccacctctgg taccctgtac atggccaaga aatggttcga cttttgaag atcaagagac 900
cagaatactt catcaccgcc aatgatgtca agcaaggtaa gcctcaccca gaaccatact 960
taaagggtag aaacggtttg ggtttcccaa ttaatgaaca agacccatcc aaatctaagg 1020
ttgttgctct tgaagacgca ccagctggta ttgctgctgg taaggctgct ggctgtaaaa 1080
tcgttggtat tgctaccact ttcgatttgg acttcttgaa ggaaaagggt tgtgacatca 1140

ES 2 521 316 T3

ttgtcaagaa ccacgaatct atcagagtcg gtgaatacaa cgctgaaacc gatgaagtcg 1200
aattgatctt tgatgactac ttatacgeta aggatgactt gttgaaatgg taattttctt 1260
ttattttttt gataaaacta ctacgctaaa aataaaataa aatgtatga tttccctcca 1320
tttccgacca attgtataat tttatatctg catgacttaa taatataata taatacttat 1380
aaaatacgaa tagaaaaatt taaaccgatg taatgcatcc ttttctttgt cgtcttcgga 1440
tgatctgccg tgacaggtgg ttcgcgcaaa tcaagctggt ttagagaatt taacacagaa 1500
ataaaaaagg aagattcaat cttcgttttt gttttatata ttactataaa agtggttttt 1560
ttagtacga cgagaagta gagtaattat aaaaggaatg cttatttaa tttatttctt 1620
agacttcttt tcagacttct tagcagcctc agtttggtcc ttaacgacct tcttaacaat 1680
ctttgttct tcaatcaaga aagctctgac gattctttcc ttgacacagt tggcacatct 1740
ggaaccaccg taa 1753

<210> 4

<211> 1753

<212> ADN

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

tctcaagtat tttggcacct cgccctgaac gaaaagctgg cactttgtcc ccagccaaac 60
tcttctctct aatatcgtct ttaacgacaa ggtaaaaaga tttctgcagt gttccgtctg 120
cgtcacatc tgtgccccac aatccgcggc gtttccgtgt aagccgtcaa gtgaggactt 180
ttcggatgct gaaagaaagt acgctcggaa aaactacata gctgcccccc taaacgggccc 240
tcccacgtga cgtaaagtag gaataataag aagocaaagtc gtttcttttt attctaaata 300
agttcgtttc ttttgatggt gtcattttca gaaatatata tatatgcgct taaatacaca 360
agctaaaaca acatagttag gattgcaaaa ggtttctttt ctactcaatt tggcttaact 420
cttttcatat taatagcgcc aaccagctag tgtttaccag atcagtggaa aacataaaa 480
caataaaaac aatattcgga atgggattga ctactaaacc tctatctttg aaagttaacg 540
ccgctttggt cgacgtcgac ggtaccatta tcactctctca accagccatt gctgcattct 600
ggagggattt cggttaaggac aaaccttatt tcgatgctga acacgttatc caagtctcgc 660
atggttgag aacgtttgat gccattgcta agttcgtctc agactttgcc aatgaagagt 720
atgttaacaa attagaagct gaaattccgg tcaagtacgg tgaaaaatcc attgaagtcc 780

ES 2 521 316 T3

cagggtgcagt taagctgtgc aacgctttga acgctctacc aaaagagaaa tgggctgtgg 840
caacttccgg taccctgat atggcacaaa aatggttcga gcctctggga atcaggagac 900
caaagtactt cattaccgct aatgatgtca aacagggtaa gcctcatcca gaaccatatac 960
tgaagggcag gaatggctta ggatatccga tcaatgagca agacccttcc aatctaagg 1020
tagtagtatt tgaagacgct ccagcaggtta ttgcccggcgg aaaagccgcc ggttgtaaga 1080
tcattgggat tgccactact ttcgacttgg acttctctaaa ggaaaaaggc tgtgacatca 1140
ttgtcaaaaa ccacgaatcc atcagagttg gcccgtacaa tgccgaaaca gacgaagttg 1200
aattcatttt tgacgactac ttatatgcta aggacgatct gttgaaatgg taatcctcta 1260
aaatcgaaca tatttgagta ataattctca gatacagtcc tattctatat tcccacaaa 1320
acaagtaatg atgctaaaaa acgacacatt tataaaatca catcttattg attaaataaa 1380
tacgtagata gatttttttt tttaaaacat atagtgtgct attatttctg actctgtctc 1440
atctcagaaa aataaatgat aaaaaaggaa gtaaaatcct taaacgttat caggttatta 1500
gcaacttgaa agtgacagga gccacaacgg attaaaattt aatttctagt aaagaaatgt 1560
caagaagagt ggttatcaca ggattgggct gtgtaacgcc gttgggaaga tcattaagtg 1620
agtcatgggg gaatctgctc tcttccaaaa atggactcac accaatcaca tctttgcccc 1680
actataatga ggactacaaa ctacagagaaa aaagtatccc atcaacgata acagtgggga 1740
agattccaga gaa 1753

<210> 5

<211> 401

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> mutante 2 del promotor TEF1

10 <400> 5

ES 2 521 316 T3

acggctctaa agtgcttcgg ctcccccttt actcctccag gttttctcag actccgcgca 60
 tcgccgtacc acctcaaagc cccaagcgc agcataccaa atctcccctc tttcttctc 120
 taggggtgtca ctagttactc gtactaaggg tttggggaag gagaaagaga cgcctcgtc 180
 ttcttttctt cgtcgaaggg ggcaatagaa gtttttatca tgtctcctt ccttgagaac 240
 cttttcttcg atcttgttct ctttcgacgg cctcccgttg gtatttaggt taatgaacgg 300
 tcttcaacct ctcaagtttc agtttccttt ctcccgctct attaogacce ttcttacttc 360
 tcaactcagta gaacgggagc atagcaatct aatccaagtt t 401

<210> 6

<211> 401

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> mutante 7 del promotor TEF1

10

<400> 6

atagcttcaa aatgtctcta ctcccttttt actcttccag attttctcgg actccgcgca 60
 ccgccgtacc acttcaaaac acccaagcac agcatactaa attcccctc ctcttctc 120
 taggggtgccg ttaattaccg gtactaaagg tttggaaaag gaaaagaga cgcctcgtc 180
 cctttttctt cgtcggagaa ggcaataaaa atttttatca cgtttcttct tcttgaaaac 240
 ttttttttcg attttgttct ctttcgacga cctcccattg atatttgagt taacaaacgg 300
 tcttcaattt ctcaagtttc agcttcattt ttctgttct attacaactt tttttacttc 360
 ttgetcattg gaaagaaagc atagcaatct aatctaagtt t 401

<210> 7

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> P9

20

<400> 7

cccaaggcag gacagttacc 20

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> P10

<400> 8

10

agcaccagat agagcaccac a

21

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> P11

<400> 9

20

ggaccaccaa cagcacctag t

21

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> P12

<400> 10

30

gtaagcaact gttgtttcag a

21

<210> 11

<211> 401

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

35

ES 2 521 316 T3

<400> 11

atagcttcaa aatgtttcta ctctttttt actcttccag attttctcgg actccgcgca 60
tcgccgtacc acttcaaac acccaagcac agcatactaa atttcccctc tttcttctc 120
taggggtgctg ttaattacc gtactaaagg tttggaaaag aaaaaagaga ccgcctcgtt 180
tctttttctt cgtcgaaaaa ggcaataaaa atttttatca cgtttctttt tcttgaaaat 240
tttttttttg atttttttct ctttcgatga cctcccattg atatttaagt taataaacgg 300
tcttcaattt ctcaagtttc agtttcattt ttcttgttct attacaactt tttttacttc 360
ttgctcatta gaaagaaagc atagcaatct aatctaagtt t 401

<210> 12

<211> 62

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> P29

10

<400> 12

atgcttgctg tcagaagatt aacaagatac acattcotta gatccaata caacagatca 60
cg 62

<210> 13

<211> 60

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> P30

20

<400> 13

cgatgtctag ctcttcaatc atctccgta ggtcttccat gttttattta ggttctatcg 60

<210> 14

<211> 22

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> P33

<400> 14

5 **ggtagattca attctcttcc**

22

<210> 15

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> P34

<400> 15

15 **aggcaacagg aaagatcaga gg**

22

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Cebador de delección de GPP

<400> 16

25 **tgtgtgagtt cctctctctt t**

21

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Cebador de delección de GPP

<400> 17

35 **tcaaaggcat tgcgatggtt**

20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador de delección de GPP

<400> 18

cgctaaggat gacttggtga

20

10 <210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Cebador de delección de GPP

<400> 19

ctctaacttc tegtgtact

20

20 <210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador de delección de GPP

<400> 20

caagcaggaa atccgtatca

20

<210> 21

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Cebador de delección de GPP

	<400> 21		
	tcatatggag caatcccact		20
	<210> 22		
	<211> 20		
5	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de delección de GPP		
10	<400> 22		
	caagtgagga cttttcggat		20
	<210> 23		
	<211> 20		
15	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de delección de GPP		
20	<400> 23		
	gtagtcaate ccattccgaa		20
	<210> 24		
	<211> 20		
25	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de delección de GPP		
30	<400> 24		
	ggacgatctg ttgaaatggt		20
	<210> 25		
	<211> 21		

ES 2 521 316 T3

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
 35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
 50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
 85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
 340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
 355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
 370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
 385 390

<210> 27

<211> 440

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 27

Met Leu Ala Val Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Thr Phe Leu Lys Arg Thr
 1 5 10 15

His Pro Val Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Tyr Lys Ile Leu Pro Ser Arg
 20 25 30

Ser Thr Phe Leu Arg Arg Ser Leu Leu Gln Thr Gln Leu His Ser Lys
 35 40 45

ES 2 521 316 T3

Met Thr Ala His Thr Asn Ile Lys Gln His Lys His Cys His Glu Asp
50 55 60

His Pro Ile Arg Arg Ser Asp Ser Ala Val Ser Ile Val His Leu Lys
65 70 75 80

Arg Ala Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr
85 90 95

Thr Ile Ala Lys Val Ile Ala Glu Asn Thr Glu Leu His Ser His Ile
100 105 110

Phe Glu Pro Glu Val Arg Met Trp Val Phe Asp Glu Lys Ile Gly Asp
115 120 125

Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr
130 135 140

Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu
145 150 155 160

Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His
165 170 175

Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro
180 185 190

His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys
195 200 205

Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln
210 215 220

Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu
225 230 235 240

His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln
245 250 255

Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His
260 265 270

ES 2 521 316 T3

Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser
 275 280 285

Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val
 290 295 300

Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu
 305 310 315 320

Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser
 325 330 335

Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile
 340 345 350

Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala
 355 360 365

Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly
 370 375 380

Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu
 385 390 395 400

Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr
 405 410 415

Gln Ile Val Tyr Asn Asn Val Arg Met Glu Asp Leu Pro Glu Met Ile
 420 425 430

Glu Glu Leu Asp Ile Asp Asp Glu
 435 440

<210> 28

<211> 250

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 28

Met Pro Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys Ile Asn Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala

ES 2 521 316 T3

<210> 29

<211> 250

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 29

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

Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala
20 25 30

Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ala Glu His
35 40 45

Val Ile Gln Val Ser His Gly Trp Arg Thr Phe Asp Ala Ile Ala Lys
50 55 60

Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asn Glu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Ile Pro Val Lys Tyr Gly Glu Lys Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala
85 90 95

Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala
100 105 110

Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Gln Lys Trp Phe Glu His
115 120 125

Leu Gly Ile Arg Arg Pro Lys Tyr Phe Ile Thr Ala Asn Asp Val Lys
130 135 140

Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys Gly Arg Asn Gly Leu
145 150 155 160

Gly Tyr Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Lys Val Val Val
165 170 175

Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly Lys Ala Ala Gly Cys
180 185 190

ES 2 521 316 T3

Lys Ile Ile Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu Asp Phe Leu Lys Glu
195 200 205

Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu Ser Ile Arg Val Gly
210 215 220

Gly Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
225 230 235 240

Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp
245 250

REIVINDICACIONES

1. Método de modificación de una célula de levadura para la producción de etanol,
 caracterizado por reducir la actividad de la proteína glicerol 3-fosfato deshidrogenasa-1, Gpd1, y reducir la actividad de la proteína glicerol 3-fosfato deshidrogenasa-2, Gpd2,
 5 por reducir, pero no eliminar, la actividad de la proteína Gpd1 y eliminar la actividad de la proteína Gpd2; o por eliminar la actividad de la proteína Gpd1 y reducir, pero no eliminar, la actividad de la proteína Gpd2; o por reducir, pero no eliminar, la actividad tanto de la proteína Gpd1 como de la proteína Gpd2,
 en el que la reducción de la actividad de la proteína Gpd1 y/o la proteína Gpd2 se consigue reduciendo la expresión del gen *GPD1* y/o el gen *GPD2*,
 10 caracterizado porque la expresión del gen *GPD1* y/o el gen *GPD2* se reduce en al menos un 50% en comparación con la expresión en una célula de levadura silvestre.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el gen *GPD1* y/o el gen *GPD2* se expresa mediante un promotor que está ligado de manera funcional al gen *GPD1* o al gen *GPD2*, en el que el promotor provoca menos de o igual al 20% de transcripción del promotor TEF1 ligado de manera funcional al gen *GPD1* o al gen *GPD2*.
 15
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el promotor es un promotor según SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 6.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por reducir adicionalmente la actividad de la proteína glicerol 3-fosfatasa-1, Gpp1, y/o la proteína glicerol 3-fosfatasa-2, Gpp2,
 20 y por reducir la actividad de la proteína Gpp1 y eliminar la actividad de la Gpp2, o por eliminar la actividad de la proteína Gpp1 y reducir la actividad de la Gpp2, o por reducir la actividad de la proteína Gpp1 y reducir la actividad de la Gpp2,
 en el que la reducción de la actividad de la proteína Gpp1 y/o la proteína Gpp2 se consigue reduciendo la expresión de la proteína Gpp1 y/o la Gpp2,
 25 caracterizado porque la expresión del gen *GPP1* y/o el gen *GPP2* se reduce en al menos un 50% en comparación con la expresión en una célula de levadura silvestre.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el gen *GPP1* y/o el gen *GPP2* se expresa mediante un promotor que está ligado de manera funcional al gen *GPP1* o al gen *GPP2*, en el que el promotor provoca menos de o igual al 20% de transcripción del promotor TEF1 ligado de manera funcional al gen *GPP1* o al gen *GPP2*.
 30
6. Método según la reivindicación 4 ó 5, caracterizado porque el promotor es un promotor según SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 6.
7. Célula de levadura modificada, en la que la actividad de la proteína Gpd1 y Gpd2 se reduce en comparación con una célula de levadura silvestre,
 35 en la que se reduce, pero no se elimina, la actividad de la proteína Gpd1 y se elimina la actividad de la proteína Gpd2; o se elimina la actividad de la proteína Gpd1 y se reduce, pero no se elimina, la actividad de la proteína Gpd2; o se reduce, pero no se elimina, la actividad tanto de la proteína Gpd1 como de la proteína Gpd2,
 40 en la que la actividad reducida se consigue mediante una expresión reducida del gen *GPD1* y/o gen *GPD2*, caracterizada porque la expresión del gen *GPD1* y/o el gen *GPD2* se reduce en al menos un 50% en comparación con la expresión del gen silvestre.
8. Célula de levadura modificada según la reivindicación 7, caracterizada porque el gen *GPD1* y/o el *GPD2* se expresa mediante un promotor que está ligado de manera funcional al gen *GPD1* o al gen *GPD2*, en la que el promotor es débil en comparación con el promotor en la célula de levadura silvestre.
 45

9. Célula de levadura modificada según la reivindicación 7 u 8, caracterizada porque el promotor es un promotor según SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 6.
10. Uso de una célula de levadura modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para producir etanol.
- 5 11. Método para la producción de etanol, que comprende las siguientes etapas:
- proporcionar una célula de levadura según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9,
 - proporcionar biomasa,
 - hacer crecer la célula de levadura en presencia de la biomasa en condiciones que permiten la producción de etanol.

10

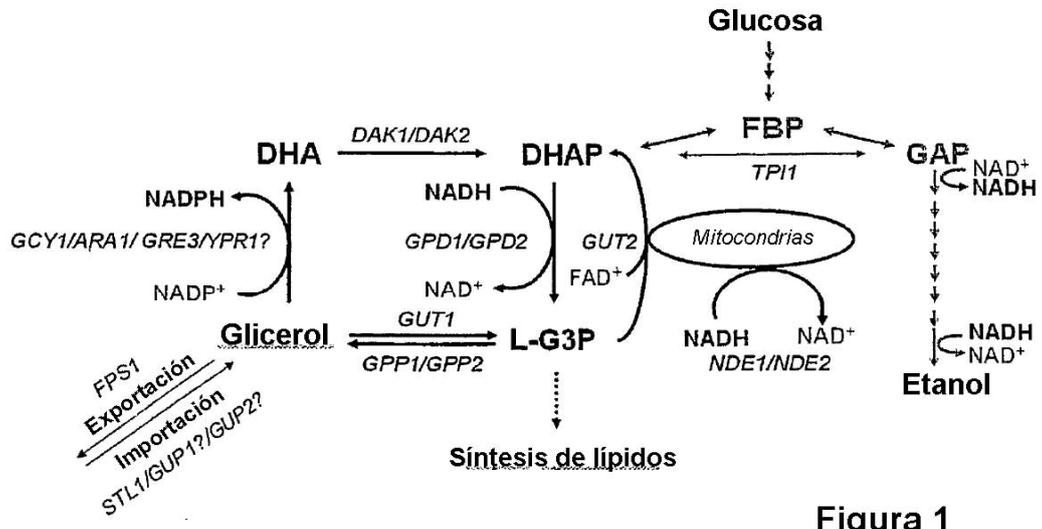


Figura 1

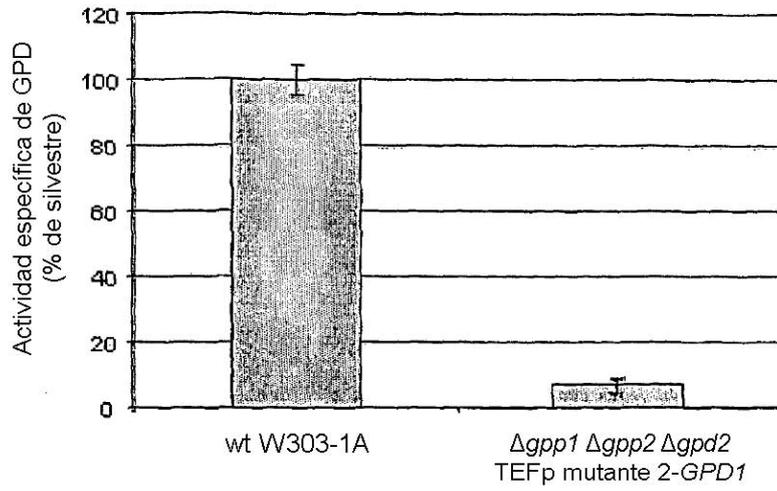


Figura 3

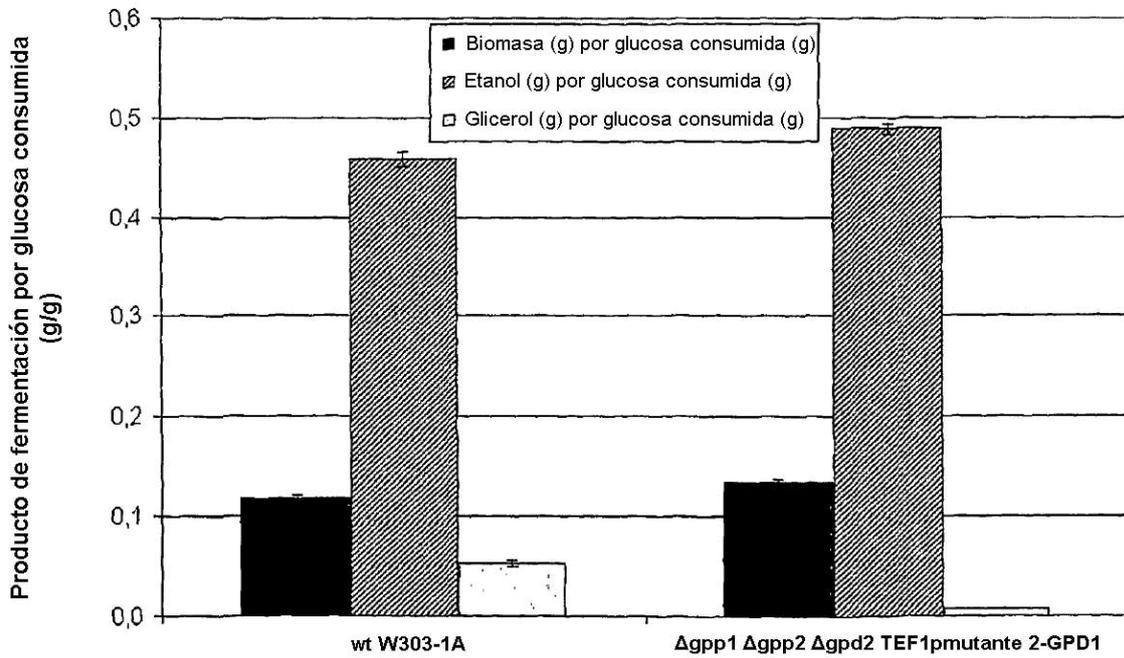


Figura 4

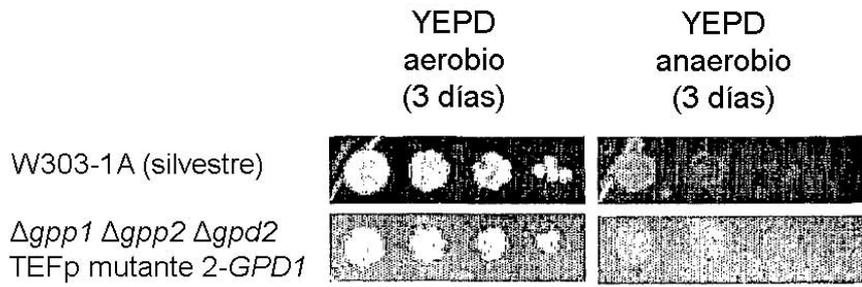


Figura 5

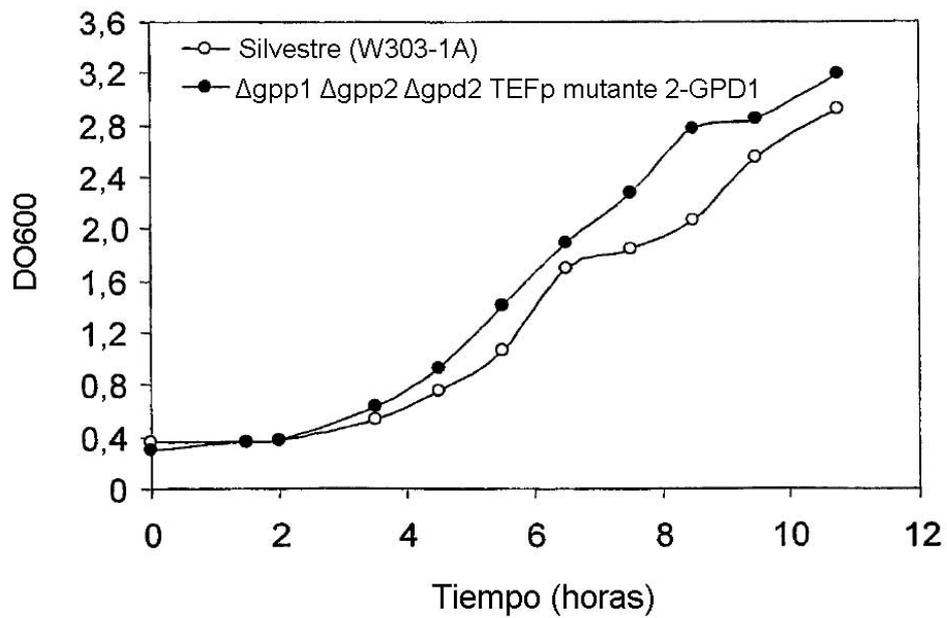


Figura 6

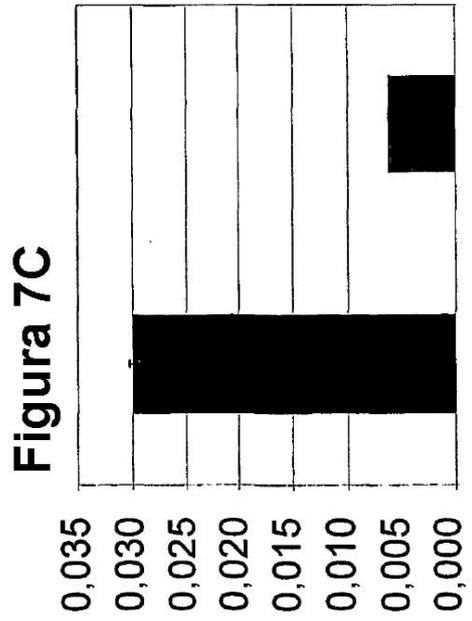
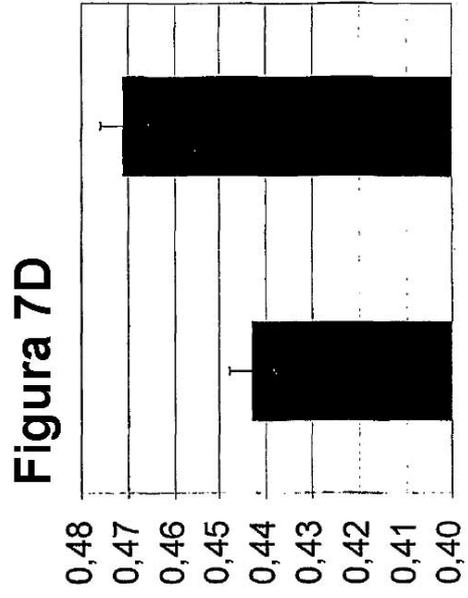
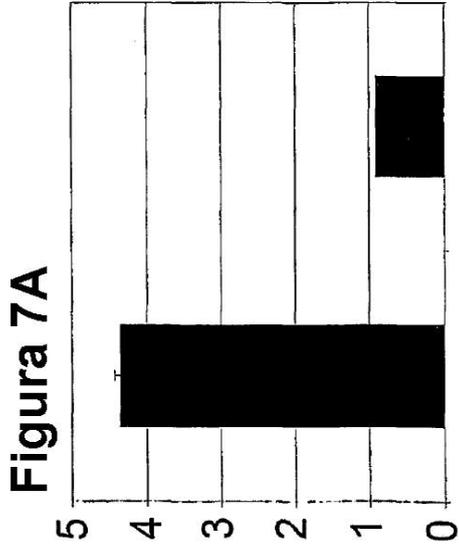
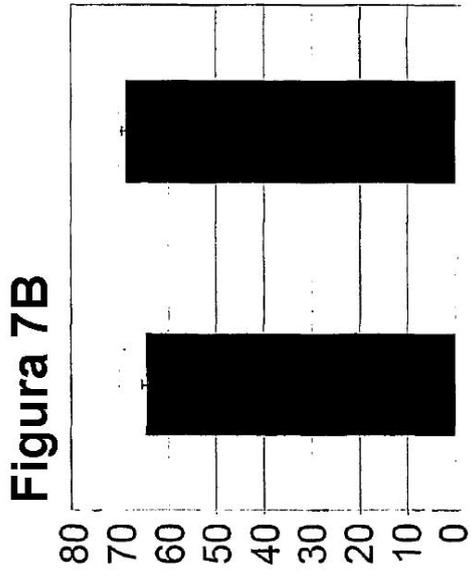


Figura 7F

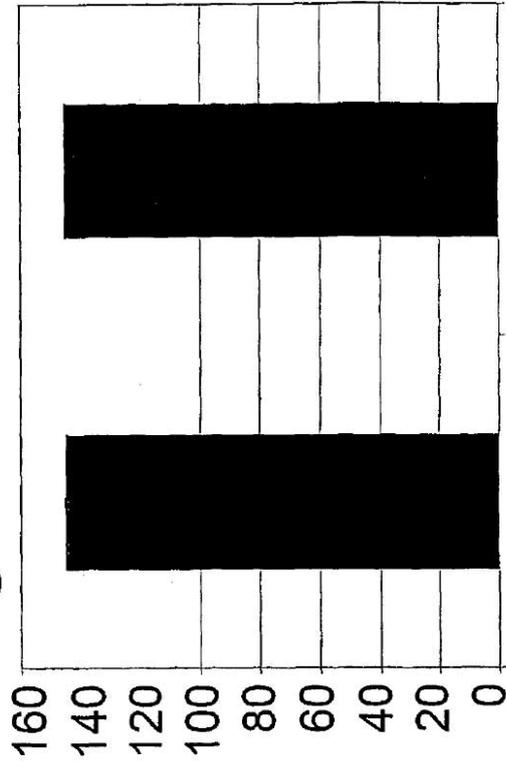


Figura 7E

