

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 770**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12P 7/40** (2006.01)

**C12P 7/56** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2007** **E 12196287 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 2586313**

54 Título: **Proceso de fermentación que emplea células de levadura que tienen una ruta alterada desde dihidroxiacetona fosfato hasta glicerol**

30 Prioridad:

**13.03.2006 US 781674 P**

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

**29.06.2017**

73 Titular/es:

**CARGILL, INCORPORATED (100.0%)  
15407 McGinty Road West  
Wayzata, MN 55391, US**

72 Inventor/es:

**DUNDON, CATHERINE ASLESON;  
SUOMINEN, PIRKKO;  
ARISTIDOU, ARISTOS;  
RUSH, BRIAN, J.;  
KOIVURANTA, KARI;  
HAUSE, BENJAMIN MATTHEW;  
MCMULLIN, THOMAS WILLIAM y  
ROBERG-PÉREZ, KEVIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 620 770 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

Proceso de fermentación que emplea células de levadura que tienen una ruta alterada desde dihidroxiacetona fosfato hasta glicerol

Esta invención se refiere a procesos de fermentación que usan levaduras modificadas genéticamente.

5 Las levaduras se usan como biocatalizadores en varias fermentaciones industriales. Existe un interés creciente por el uso de levaduras para fermentar carbohidratos hasta ácidos orgánicos, tales como ácido láctico. A medida que se produce más ácido orgánico en estas fermentaciones, el medio de fermentación se hace cada vez más ácido. La mayoría de las bacterias que producen estos ácidos orgánicos no tienen un buen comportamiento en los medios intensamente ácidos - no sobreviven en esas condiciones o producen tan lentamente que el proceso se hace económicamente inviable. Como resultado, se hace necesario tamponar el medio para mantener un pH más elevado. Esto provoca dificultades en la recuperación del producto en forma de ácido. Se prefiere llevar a cabo la fermentación a un pH inferior, en el que el producto está parcialmente o completamente en forma de ácido.

10 Las especies de levaduras se han considerado candidatos para tales fermentaciones a pH bajo. Muchas especies de levaduras fermentan de manera natural carbohidratos de hexosa hasta etanol, pero pocas o ninguna producen de manera natural rendimientos significativos de ácidos orgánicos, tales como ácido láctico. Por lo tanto, se han hecho esfuerzos para modificar genéticamente diversas especies de levaduras para insertar uno o más genes que permitirán que la célula produzca ácido láctico. Para desviar el metabolismo de carbohidratos desde la producción de etanol hasta la producción de ácido láctico, estas células también se han modificado genéticamente para alterar o deleccionar el gen nativo de la piruvato descarboxilasa (PDC). Este trabajo se describe, por ejemplo, en los documentos WO 99/14335, WO 00/71738 A1, WO 02/42471 A2, WO 03/049525 A2, WO 03/102152 A2 y WO 03/102201 A2.

15 El documento WO 2004/048559 describe la modificación de *S. cerevisiae* por medio de la inserción de un gen exógeno.

25 En muchas de estas fermentaciones con levaduras se produce glicerol con un rendimiento significativo. El glicerol puede servir como osmoprotector para la célula. La formación de glicerol puede ayudar a regenerar cofactores redox en las condiciones de fermentación.

30 Se produce glicerol en muchas células de levadura mediante la metabolización de dihidroxiacetona fosfato (DHAP). En la mayoría de especies de levaduras, DHAP se reduce mediante una enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD, nombre sistemático sn-glicerol-3-fosfato:NAD<sup>+</sup> 2-oxidorreductasa, EC 1.1.1.8) para formar glicerol-3-fosfato (G3P). G3P sirve como precursor para la biosíntesis de lípidos, y también como precursor de glicerol. G3P se desfosforila hasta glicerol mediante una enzima glicerol-3-fosfatasa (GPP, nombre sistemático glicerol-1-fosfato fosfohidrolasa, EC 3.1.3.21).

35 Existe una ruta alternativa para la producción de glicerol, que es importante para ciertas levaduras, tales como *S. pombe*. En esta ruta, la dihidroxiacetona fosfato se desfosforila hasta dihidroxiacetona mediante la dihidroxiacetona fosfato fosfatasa. La dihidroxiacetona se convierte después en glicerol junto con la oxidación de NADH mediante una glicerol deshidrogenasa dependiente de NADH<sup>+</sup> (nombre sistemático glicerol:NAD<sup>+</sup> 2-oxidorreductasa, EC 1.1.1.6).

40 Debido a que la producción de glicerol consume carbono que de otra manera se podría usar para producir un producto de fermentación más deseable, esta producción de glicerol representa una fuente significativa de pérdida de rendimiento. Además, la producción de glicerol se produce a costa de ATP y NADH. Esto desvía la energía de la producción de biomasa o del producto deseado. Por ambas razones, se desearía reducir o eliminar la producción de glicerol por parte de la célula. Una consideración adicional es que la reducción o eliminación de la producción de glicerol podría simplificar la recuperación y purificación del producto deseado.

45 Se ha modificado genéticamente una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para deleccionar sus genes nativos de GPD, privando así a la célula de la enzima GPD e impidiendo la producción de glicerol. Véase Nissen *et al.*, "Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis", *Yeast*, 2000: 16:463-474. Nissen *et al.* informó que las células mutadas crecieron muy escasamente en condiciones anaerobias y aerobias cuando se alteraron ambos genes nativos de GPD. Según Nissen *et al.*, las células mutadas produjeron mucho menos glicerol que las células de tipo natural. Nissen *et al.* planteó la hipótesis de que el crecimiento escaso observado en las cepas con doble deleción se debió a una reducción de la reserva de NAD<sup>+</sup> de la célula, debido a que no se dispuso de la producción de glicerol para oxidar el NADH de la célula.

50 Sería deseable proporcionar una célula de levadura que produjera un producto orgánico deseado, que produjera poco o ningún glicerol, y que también creciera bien en condiciones aerobias, condiciones anaerobias o condiciones tanto aerobias como anaerobias.

55 La invención se refiere a un proceso de fermentación en el que una célula de levadura pre-duplicación del genoma completo que tiene una ruta metabólica nativa desde dihidroxiacetona fosfato hasta glicerol-3-fosfato hasta glicerol, que está modificada genéticamente para deleccionar o alterar al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfato

deshidrogenasa, se cultiva en condiciones de fermentación y en presencia de una fuente de carbono para producir un producto de fermentación deseado, en el que el rendimiento de glicerol es menor del 2% respecto del peso de la fuente de carbono que consume la célula, y por lo que se añade glicerol al medio de fermentación;

5 en el que la fuente de carbono es un carbohidrato de hexosa, un oligómero de glucosa, un carbohidrato de pentosa, o un oligómero de xilosa;

en el que la levadura pre-duplicación del genoma completo se selecciona de la especie *Issatchenkia orientalis*, *Pichia galeiformis*, *Pichia* sp. YB-4149 (denominación del NRRL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifaciens* y *P. fermentans*.

10 Se describe además una célula de levadura mutante de una especie de levadura pre-duplicación del genoma completo, que tiene una delección o alteración de una ruta metabólica nativa desde dihidroxiacetona fosfato hasta glicerol. La delección o alteración de la ruta metabólica nativa puede incluir una delección o alteración de al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD). La delección o alteración de la ruta metabólica nativa puede incluir una delección o alteración de al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfatasa (GPP). Puede incluir una delección o alteración de al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfatasa (GPP). La delección o alteración de la ruta metabólica nativa puede incluir una delección o alteración de al menos un gen nativo de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa, gen nativo de glicerol deshidrogenasa, o ambos.

20 Se describe además una célula de levadura mutante de una especie de levadura pre-duplicación del genoma completo, cuya célula mutante produce menos que 2,0 g/L de glicerol cuando se cultiva en las condiciones microaerobias estándar siguientes:

A. Medio acuoso definido que contiene, en el inicio del cultivo, 5 g/L de sulfato de amonio, 3 g/L de fosfato monopotásico, 0,5 g/L de sulfato magnésico, oligoelementos, vitaminas, 150 g/L de glucosa;

B. pH al inicio del cultivo de 3,5, con el medio de fermentación tamponado si es necesario para impedir que el pH caiga por debajo de 3,0 o se eleve por encima de 7,0 durante el cultivo;

25 C. Cultivo inoculado con la célula de levadura hasta una  $DO_{600}$  de 1,0;

D. Temperatura de cultivo 30 °C;

E. Cultivo continuado hasta que la concentración de glucosa se reduce hasta 10 g/L, pero no continúa durante más de 120 horas;

F. Ventilación y agitación suficiente para producir una tasa de consumo de oxígeno de  $5,0 \pm 1,0$  mmol/L/hr.

30 Se describe además una célula de levadura mutante de una especie de levadura pre-duplicación del genoma completo, que carece de la capacidad de producir una enzima activa glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GDP). Para los fines de esta invención, se considera que una célula carece de la capacidad de producir una enzima activa si la actividad de tal enzima en la célula se reduce en al menos un 75%, preferiblemente al menos un 90%, en comparación con la actividad de esa enzima en la cepa de tipo natural. La actividad enzimática de cualquier enzima particular se puede determinar mediante el uso de métodos de ensayo adecuados. Existen kits de ensayo comerciales para determinar la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Un ejemplo de tal producto se denomina MK426 de Takara Bio Inc. y está disponible por medio de Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania.

35 Se describe además una célula de levadura mutante de una especie de levadura pre-duplicación del genoma completo, que carece de la capacidad de producir una enzima activa glicerol-3-fosfatasa.

40 La invención describe además una célula de levadura mutante que carece de la capacidad de producir una enzima activa de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa que producen de manera nativa las células de tipo natural de la especie de levadura, que carece de la capacidad de producir una enzima activa de glicerol deshidrogenasa dependiente de  $NADH^+$  que producen de manera nativa las células de tipo natural de la especie de levadura, o ambas.

45 Se describe además una célula de levadura mutante que está modificada genéticamente para producir un producto de ácido orgánico, y dicha célula de levadura tiene además una delección o alteración de una ruta metabólica nativa desde dihidroxiacetona fosfato hasta glicerol y una delección o alteración de una ruta metabólica nativa desde piruvato hasta etanol. La delección o alteración de la ruta metabólica nativa puede incluir una delección o alteración de al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. La delección o alteración de la ruta metabólica nativa puede incluir una delección o alteración de al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfatasa. Puede incluir una delección o alteración de al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfatasa.

50 Se ha descubierto que las células útiles en la invención producen niveles muy bajos de glicerol cuando se cultivan en condiciones de fermentación. Se ha descubierto que la producción de glicerol es menor de 0,2 g/L en una diversidad de condiciones de fermentación. Sorprendentemente, las células útiles en la invención crecen bien en condiciones

de fermentación, a pesar de la carencia de producción de glicerol, y en ciertas realizaciones a pesar de la carencia de producción de glicerol-3-fosfato. También se ha descubierto que en ciertos casos las células útiles en la invención tienen una tolerancia mejorada al ácido. Por lo tanto, la invención es un proceso de fermentación en el que una célula de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención se cultiva en condiciones de fermentación para producir un producto de fermentación, en el que el rendimiento de la fuente de carbono respecto del glicerol es menor del 2% en peso.

La Figura 1 es un diagrama que representa el plásmido pBH158.

La Figura 2 es un diagrama que representa el plásmido pBH159.

La Figura 3 es un diagrama que representa el plásmido pBH160.

10 La Figura 4 es un diagrama que representa el plásmido pBH161.

La Figura 5 es un diagrama que representa el plásmido pMM28.

La Figura 6 es un diagrama que representa el plásmido pMI318.

La Figura 7 es un diagrama que representa el plásmido pMI321.

La Figura 8 es un diagrama que representa el plásmido pMI355.

15 La Figura 9 es un diagrama que representa el plásmido pMI357.

La Figura 10 es un diagrama que representa el plásmido pMI433.

La Figura 11 es un diagrama que representa el plásmido pMI449.

La Figura 12 es un diagrama que representa el plásmido pMI454.

La Figura 13 es un diagrama que representa el plásmido pBH165.

20 La Figura 14 es un diagrama que representa el plásmido pTMC61.

Las células de levadura útiles en la invención se producen llevando a cabo ciertas modificaciones genéticas en una célula de levadura hospedadora. La célula de levadura hospedadora es una que, como cepa de tipo natural, es capaz nativamente de metabolizar al menos un carbohidrato hasta glicerol. La ruta metabólica nativa puede implicar una ruta metabólica desde dihidroxiacetona fosfato hasta glicerol-3-fosfato hasta glicerol. La ruta nativa puede implicar una ruta metabólica desde dihidroxiacetona fosfato hasta dihidroxiacetona hasta glicerol. Las células hospedadoras pueden contener ambas rutas metabólicas nativas.

El término "nativo", cuando se usa en la presente memoria con respecto a materiales genéticos (p.ej., un gen, promotor, terminador u otra secuencia de ADN), se refiere a materiales genéticos que se hallan (aparte de mutaciones entre individuos que no afectan a la función) dentro del genoma de las células de tipo natural de esa especie de levadura. "Capacidad nativa" (y sus variaciones, tales como "capaces de manera nativa") indican la capacidad de las células de tipo natural de llevar a cabo la función indicada. Por ejemplo, una célula es capaz nativamente de metabolizar un carbohidrato hasta glicerol si las células de tipo natural de esa especie poseen esa capacidad antes de cualquier modificación genética. Se considera que un gen es "funcional" dentro de una célula si funciona dentro de la célula para producir una proteína activa. Una "ruta nativa" o "ruta metabólica nativa" se refiere a una ruta metabólica que existe y es activa en las células de tipo natural de esa especie de levadura. Una especie de levadura "produce de manera nativa" una enzima si las células de tipo natural de esa especie de levadura producen la enzima en una forma activa.

En esta invención, "exógeno" significa, con respecto a cualquier material genético, que no es nativo respecto de la célula hospedadora.

40 Cuando se caracterizó por primera vez, a la especie *I. orientalis* se le asignó el nombre *Pichia kudriavzevii*. El anamorfo (forma asexual) de *I. orientalis* se conoce como *Candida krusei*. Las cepas adecuadas de *I. orientalis* son la cepa de la ATCC 32196 y la cepa de la ATCC PTA-6648.

"Delección o alteración" de una ruta metabólica significa que la ruta se hace completamente inoperativa, o si no que su actividad se reduce al menos un 75%, preferiblemente al menos un 90%, respecto de la célula de tipo natural. Una actividad de una ruta se puede reducir reduciendo la cantidad de enzima activa que se produce, reduciendo la actividad de la enzima que se produce, o cierta combinación de ambas. "Delección o alteración" de un gen quiere decir que la región codificante completa del gen se elimina (delección), o la región codificante del gen, su promotor, y/o su región terminadora se modifican (tal como mediante delección, inserción, o mutación) de forma que el gen ya no produce una enzima activa, el gen produce una cantidad seriamente reducida (al menos una reducción del 75%, preferiblemente al menos una reducción del 90%) de la enzima activa, o el gen produce una enzima con una

actividad seriamente reducida (reducida al menos un 75%, preferiblemente reducida al menos un 90%).

En la mayoría de casos, la delección o alteración de la ruta metabólica nativa implicará una delección o alteración de al menos un gen de GPD, al menos un gen de GPP, o ambos. En células tales como *S. pombe*, que tienen una ruta metabólica alternativa basada en dihidroxiacetona fosfato fosfatasa y glicerol deshidrogenasa, la delección o alteración de la ruta metabólica nativa incluirá normalmente una delección o alteración del gen de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa, el gen de glicerol deshidrogenasa, o ambos. En las células que tienen ambas rutas, se pueden llevar a cabo delecciones o alteraciones de ambas rutas.

Las expresiones "gen de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa" y "gen de GPD" se usan en la presente memoria para referirse a (a) cualquier gen que codifica una proteína con actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y/o (b) cualquier secuencia de ADN cromosómica que codifica una enzima que es al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60% y más preferiblemente al menos un 65% idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas como SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, o SEQ. ID. N° 7. "Actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa" se refiere a la capacidad de una proteína de catalizar la reacción desde DHAP hasta glicerol-3-fosfato. Para los fines de esta invención, la identidad en porcentaje de las secuencias de aminoácidos de ADN, ARN o proteínas se puede calcular de manera conveniente mediante el uso del programa informático BLAST (herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas del NCBI) versión 2.2.1 con los parámetros por defecto. Las secuencias que tienen un índice de identidad de al menos XX%, mediante el uso del algoritmo BLAST, versión 2.2.13, con los parámetros por defecto, se consideran idénticas en al menos un XX%. El programa informático BLAST está disponible del Centro Nacional de Información Biológica, Bethesda, Maryland.

De forma similar, "gen de glicerol-3-fosfatasa" y "gen de GPP" se usan en la presente memoria para designar (a) cualquier gen que codifica una proteína con actividad de glicerol-3-fosfatasa y/o (b) cualquier secuencia de ADN cromosómico que codifica una proteína que es idéntica en al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60% y más preferiblemente al menos un 65% respecto de cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas como SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9, SEQ. ID. N° 10, SEQ. ID. N° 11 o SEQ. ID. N° 12. "Actividad de glicerol-3-fosfatasa" se refiere a la capacidad de una proteína de catalizar la desfosforilación de glicerol-3-fosfato para formar glicerol.

La expresión "gen de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa" se usa en la presente memoria para indicar cualquier gen que codifica una proteína con actividad de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa. "Gen de glicerol deshidrogenasa" se usa en la presente memoria para indicar (a) cualquier gen que codifica una proteína con actividad de glicerol deshidrogenasa y/o (b) cualquier secuencia de ADN cromosómica que codifica una proteína que es idéntica en al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60% y más preferiblemente al menos un 65% respecto de la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ. ID. N° 13. "Actividad de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa" se refiere a la capacidad de una proteína de catalizar la reacción de dihidroxiacetona fosfato hasta dihidroxiacetona. "Actividad de glicerol deshidrogenasa" se refiere a la capacidad de una proteína de catalizar la reducción de dihidroxiacetona hasta glicerol.

La delección o alteración de cualquiera de los genes anteriores se puede llevar a cabo mediante evolución forzada, mutagénesis, o métodos de ingeniería genética, seguido de selección o cribado adecuado para identificar los mutantes deseados.

En los métodos de mutagénesis, las células se exponen a radiación ultravioleta o una sustancia mutagénica, en condiciones suficientes para conseguir una tasa de mortalidad elevada (60-99,9%, preferiblemente 90-99,9%) de las células. Las células que sobreviven se colocan en placas y se seleccionan o se criban en busca de células que tienen la actividad metabólica delecionada o alterada. Las células que tienen la mutación deseada se pueden cribar basándose en su capacidad reducida de producir glicerol. La alteración o delección de cualquiera de los genes anteriores se puede confirmar por medio de PCR o métodos de análisis de Southern.

La ingeniería genética para delecionar o alterar la ruta metabólica hasta glicerol se lleva a cabo de manera conveniente en una o más etapas por medio del diseño y la construcción de construcciones de delección adecuadas y la transformación de la célula hospedadora con esas construcciones. El término "construcción" se usa en la presente memoria para indicar una secuencia de ADN que se usa para transformar una célula. La construcción puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido o vector circular, en forma de un plásmido o vector linealizado, puede ser una porción de un plásmido o vector circular (tal como se obtiene digiriendo el plásmido o vector con una o más enzimas de restricción), o puede ser un producto de PCR preparado mediante el uso de un plásmido o vector como molde. La selección o el cribado se usan a continuación para identificar los transformantes eficaces. Se pueden usar métodos de transformación por electroporación y/o química (tales como los basados en cloruro de calcio o acetato de litio).

La siguiente discusión de las construcciones de delección es igualmente aplicable a la delección o alteración de cualquiera de los genes de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, glicerol-3-fosfatasa, dihidroxiacetona fosfato fosfatasa o glicerol deshidrogenasa.

Se ensambla de manera conveniente una construcción de delección clonando primero dos secuencias de ADN del gen objetivo y/o sus regiones flanqueantes en posición anterior (5') o posterior (3'). Las secuencias preferiblemente no son contiguas, pero pueden ser contiguas si se va a interponer material genético adicional (tal como un casete de

marcador de selección) entre ellas en la construcción. En este contexto, "no contiguo" significa que las secuencias de ADN no están inmediatamente adyacentes entre sí en el genoma de tipo natural, sino que están separadas entre sí en el genoma de tipo natural por un área que se va a delecionar para delecionar o alterar el gen. Las secuencias "Contiguas" están directamente adyacentes entre sí en el genoma de tipo natural. Una de las secuencias puede incluir una región en 5' del promotor del gen objetivo, la totalidad o una porción de la región del promotor, la totalidad o una porción de la región codificante del gen objetivo, o cierta combinación de las mismas. La otra secuencia puede incluir una región en 3' respecto del terminador del gen objetivo, la totalidad o una porción de la región terminadora, y/o la totalidad o una porción de la región codificante del gen objetivo. Después se produce una construcción de delección que contiene las dos secuencias orientadas en la misma dirección entre sí como aparecen de manera nativa en el cromosoma de la célula hospedadora. En general, se clona un marcador de selección entre las secuencias para permitir la selección de los transformantes, como se describe más completamente más adelante. Esta construcción se usa para transformar la célula hospedadora. Se pueden usar métodos de transformación por electroporación y/o química (tales como los basados en cloruro de calcio o acetato de litio).

En los transformantes eficaces, un evento de recombinación homóloga en el locus del gen objetivo da como resultado la alteración o la delección del gen funcional. Se deleciona la totalidad o una porción del gen objetivo nativo, su promotor y/o terminador durante este evento de recombinación. Si la construcción de delección contiene material genético entre las dos secuencias tomadas del locus objetivo (tal como un casete de marcador de selección o casete de gen estructural), ese material genético se inserta en el genoma de la célula hospedadora en el locus del material delecionado. Se puede llevar a cabo un análisis mediante PCR o análisis de Southern para confirmar que ha tenido lugar la delección deseada.

Normalmente es deseable que la construcción de delección también pueda incluir un casete de marcador de selección funcional. Cuando se usa una construcción de delección simple, el casete de marcador reside en el vector en posición posterior (es decir, en la dirección 3') de la secuencia de 5' del locus objetivo y en posición anterior (es decir, en la dirección 5') de la secuencia de 3' del locus objetivo. Los transformantes eficaces contendrán el casete de marcador de selección, que confiere a la célula transformada de manera eficaz cierta característica que proporciona una base para la selección. Un "gen marcador de selección" es uno que codifica una proteína necesaria para la supervivencia y/o el crecimiento de la célula transformada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, (tales como, por ejemplo, zeocina (gen *ble* de resistencia a bleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus*), *G418* (gen de resistencia a kanamicina de Tn903) o higromicina (gen de resistencia a antibióticos aminoglicósidos de *E. coli*)), (b) complementan deficiencias auxótrofas de la célula (tales como, por ejemplo, la deficiencia del aminoácido leucina (gen *LEU2* de *K. marxianus*) o la deficiencia de uracilo (p.ej., gen *URA3* de *K. marxianus* o *S. cerevisiae*)); (c) permiten que la célula sintetice nutrientes críticos que no están disponibles en los medios simples, o (d) confieren a la célula la capacidad de crecer con una fuente de carbono particular (tal como un gen *MEL5* de *S. cerevisiae*, que codifica la enzima alfa-galactosidasa (melibiasa), y confiere la capacidad de crecer con melibiosa como única fuente de carbono). Los marcadores de selección preferidos incluyen el gen de resistencia a zeocina, el gen de resistencia *G418*, un gen *MEL5* y el gen de resistencia de higromicina. Otro marcador de selección preferido es un casete de gen de L-lactato:ferricitocromo c oxidorreductasa (*CYB2*), con tal de que la célula hospedadora carezca de manera nativa de tal gen o que su(s) gen(es) nativo(s) *CYB2* se delecionen o alteren primero.

El casete de marcador de selección incluirá además secuencias promotoras y terminadoras, unidas de forma operable al gen marcador de selección, y que son operables en la célula hospedadora. Un tipo adecuado de promotor es idéntico en al menos un 50%, 70%, 90%, 95% o 99% a un promotor que es nativo para un gen de levadura. Un tipo más adecuado de promotor es idéntico en al menos un 50%, 70%, 90%, 95% o 99% a un promotor para un gen que es nativo para la célula hospedadora. Los promotores especialmente útiles incluyen los promotores de genes de piruvato descarboxilasa (*PDC1*), fosfoglicerato quinasa (*PGK*), xilosa reductasa (*XR*), xilitol deshidrogenasa (*XDH*), L-(+)-lactato-citocromo c oxidorreductasa (*CYB2*), factor de elongación de la traducción-1 (*TEF1*) y factor de elongación de la traducción-2 (*TEF2*), especialmente de los genes respectivos de la célula hospedadora. Un promotor especialmente útil incluye la porción funcional de un promotor para un gen *PDC1*, *PGK*, *TEF1* o *TEF2* nativo para la célula hospedadora, o una secuencia que es al menos idéntica en un 80, 85, 90 o 95% a tal promotor de *PDC1*, *PGK*, *TEF1* o *TEF2*.

Un tipo adecuado de terminador es idéntico en al menos un 50%, 70%, 90%, 95% o 99% a un terminador de un gen que es nativo para una célula de levadura. El terminador puede ser idéntico en al menos un 50%, 70%, 90%, 95% o 99% a un terminador para un gen que es nativo para la célula hospedadora. Los terminadores especialmente útiles incluyen los terminadores de los genes de piruvato descarboxilasa (*PDC1*), xilosa reductasa, (*XR*), xilitol deshidrogenasa (*XDH*), L-lactato:ferricitocromo c oxidorreductasa (*CYB2*) o iso-2-citocromo c (*CYC*), o un terminador de la familia de genes de galactosa en levadura, especialmente el denominado terminador de *GAL10*. Un terminador especialmente preferido incluye una porción funcional de un terminador para un gen *GAL10* nativo para la célula hospedadora, o una secuencia que es idéntica en al menos un 80, 85, 90 o 95% a dicho terminador.

La construcción de delección se puede diseñar de forma que el casete de marcador de selección pueda delecionarse espontáneamente como resultado de un evento de recombinación homóloga posterior. Una manera adecuada de conseguir esto es diseñar el vector de forma que el casete de gen estructural esté flanqueado por secuencias de repeticiones directas. Las secuencias de repeticiones directas son secuencias de ADN idénticas, nativas o no

- nativas para la célula hospedadora, y orientadas en la construcción en la misma dirección entre sí. Las secuencias de repeticiones directas tienen de manera ventajosa una longitud de alrededor de 50-1500 pb. No es necesario que las secuencias de repeticiones directas codifiquen nada. Esta construcción permite que se dé un evento de recombinación homóloga. Este evento se da con una frecuencia muy baja, y da como resultado células que
- 5 contienen una delección del gen marcador de selección y una de las secuencias de repeticiones directas. Puede ser necesario cultivar los transformantes durante varias rondas en medios no selectivos para permitir que se dé la recombinación homóloga espontánea en algunas de las células. Las células en las que se ha delecionado espontáneamente el gen marcador de selección se pueden seleccionar o cribar basándose en su pérdida de la característica de selección conferida por el gen marcador de selección.
- 10 La construcción de delección del gen objetivo puede contener además un casete de gen estructural, de nuevo localizado en posición posterior a la región flanqueante de 5' y en posición anterior a la región flanqueante de 3', pero preferiblemente sin estar dentro de ningún casete de marcador de selección que pueda haber presente. Tal construcción permite la delección simultánea del gen objetivo y la inserción de un gen estructural. "Gen estructural" quiere decir cualquier gen que codifique una proteína, distinta del gen objetivo o de un gen marcador de selección
- 15 como se describió anteriormente. Se puede usar una amplia diversidad de genes estructurales, pero los de interés particular para esta invención son un gen que confiere a la célula la capacidad de producir un ácido orgánico, o un gen que confiere a la célula la capacidad de consumir una fuente de carbono particular, tal como un carbohidrato de pentosa.
- En los casos en los que se usa un marcador de selección, la transformación se puede llevar a cabo con un par de construcciones de delección en vez de una única construcción de delección. Un elemento del par contendrá la primera secuencia del locus del gen objetivo y una parte no funcional del casete de gen marcador. El otro elemento del par contendrá la segunda secuencia del locus del gen objetivo y otra parte no funcional del casete de gen marcador. Las dos partes del casete de gen marcador se seleccionan de manera que juntas forman un casete completo. Los extremos de cada una de las dos partes del casete de gen marcador comparten una secuencia común, es decir, una
- 20 porción del casete está duplicada en los extremos de cada una de las dos partes. La célula se transforma con estos de manera simultánea para llevar a cabo la delección o alteración deseada, con la formación de un casete de marcador o gen estructural completo y funcional. Una proporción de las células integrarán de manera homóloga ambas construcciones de delección en el locus objetivo, y afrontarán un evento de recombinación homóloga adicional para reconstituir un casete de gen de selección funcional a partir de los dos fragmentos no funcionales. Los transformantes eficaces se pueden seleccionar basándose en la característica conferida por el marcador de selección.
- 25 Cuando la ruta metabólica nativa de la célula incluye la ruta de dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato a glicerol (por medio de las enzimas GDP y GPP), se puede delecionar o alterar cualquiera de el/los gen(es) GDP o gen(es) GPP. Se pueden delecionar los dos genes GDP y GPP. En tal caso, la delección o alteración de ambos genes GDP y GPP se puede realizar de manera simultánea o de manera secuencial en cualquier orden. Si la célula contiene múltiples genes GDP o GPP, o múltiples alelos de tales genes, se prefiere delecionar todos los que sean funcionales en la célula. En los casos en los que la ruta metabólica nativa de la célula incluya la ruta de dihidroxiacetona fosfato hasta dihidroxiacetona hasta glicerol (por medio de una dihidroxiacetona fosfato fosfatasa y glicerol deshidrogenasa), se puede delecionar o alterar cualquiera de los genes de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa o de glicerol
- 30 deshidrogenasa. Se pueden delecionar o alterar los dos genes de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa o glicerol deshidrogenasa, lo que se puede realizar de manera simultánea o secuencial, en cuyo caso se puede realizar en cualquier orden. Como antes, preferiblemente se delecionan todas las copias o alelos funcionales múltiples de tales genes.
- En ciertos aspectos de la invención, la célula es capaz de producir un ácido orgánico deseado (o su sal). Esta capacidad se manifiesta por la capacidad de convertir al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 50%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90% en peso de una fuente de carbono hasta el ácido orgánico deseado cuando se cultiva en al menos un conjunto de condiciones de fermentación. Como pocas células de levadura tienen la capacidad nativa de producir tales ácidos, la célula útil en la invención contendrá en la mayoría de los casos al menos un gen exógeno funcional que le permita producir el ácido.
- 35 Las células de interés particular producen lactato, lo cual quiere decir ácido láctico o una sal del mismo. En tal caso, la célula útil en la invención contiene al menos un gen de lactato deshidrogenasa (*LDH*) funcional exógeno integrado en su genoma. Un gen *LDH* es uno que codifica una enzima lactato deshidrogenasa funcional. Una enzima *LDH* funcional es una que cataliza la reducción de piruvato a lactato. Los genes *LDH* son específicos de la producción de L-*LDH* o D-*LDH*, lo que permite respectivamente a la célula producir el enantiómero de ácido L- o D-láctico (o sus sales). Es posible que la célula modificada útil en la invención contenga ambos genes de L- y D-*LDH*, y así sea capaz de producir ambos enantiómeros de ácido láctico. Sin embargo, se prefiere que solamente haya presentes genes de L- o D-*LDH*, de forma que la célula produzca un producto de ácido láctico más puro ópticamente.
- 40 Los genes *LDH* adecuados incluyen los obtenidos de fuentes bacterianas, fúngicas, de levaduras o de mamíferos. Los ejemplos de genes L-*LDH* específicos son los obtenidos de *L. helveticus*, *L. casei*, *B. megaterium*, *P. acidilactici* y fuentes bovinas. Los ejemplos de genes D-*LDH* específicos son los obtenidos de *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, y *L. pentosus*. Son adecuados los genes funcionales que son idénticos o al

menos un 80% idénticos a cualquiera de estos genes *L-LDH* o *D-LDH*. Los genes nativos obtenidos de cualquiera de estas fuentes se pueden someter a mutagénesis, si es necesario, para proporcionar una secuencia codificante que comience con el codón de inicio eucariótico habitual (ATG), o para otros fines. Un gen *L-LDH* preferido es el obtenido de *L. helveticus* o uno que sea idéntico en al menos un 80%, 85%, 90% o 95% a tal gen. Otro gen *L-LDH* preferido es el obtenido de *B. megaterium* o uno que sea idéntico en al menos un 80%, 85%, 90% o 95% a tal gen. Un gen *D-LDH* preferido es el obtenido de *L. helveticus* o uno que sea idéntico en al menos un 80%, 85%, 90% o 95% a tal gen.

Los genes *LDH* especialmente adecuados incluyen los que codifican una enzima con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 60%, especialmente al menos un 80%, 85% o 95%, a SEQ. ID. N° 45 del documento WO 03/049525 o comparada con SEQ. ID. N° 49 del documento WO 03/049525. Los genes *LDH* especialmente adecuados también incluyen los que codifican una enzima que tiene una secuencia proteica que es idéntica en al menos un 60%, 80%, 85% o 95% a SEQ. ID. N° 46 o 50 del documento WO 03/049525.

La célula transformada puede contener un único gen *LDH* o múltiples genes *LDH*, tal como de 1 a 10 genes *LDH*, especialmente de 1 a 5 genes *LDH*. Cuando la célula transformada contiene múltiples genes *LDH*, los genes individuales pueden ser copias del mismo gen, o incluir copias de dos o más genes *LDH* diferentes. Las copias múltiples del gen *LDH* exógeno se pueden integrar en un único locus (de forma que están adyacentes entre sí), o en varios loci en el genoma la célula hospedadora.

El gen *LDH* exógeno está bajo control transcripcional de uno o más promotores y uno o más terminadores, y ambos son funcionales en la célula de levadura modificada. Los promotores y terminadores adecuados son como se describieron antes con respecto al casete del gen marcador de selección, y se describen también en los documentos WO 99/14335, WO 00/71738, WO 02/42471, WO 03/102201, WO 03/102152 y WO 03/049525. Un promotor especialmente útil incluye la porción funcional de un promotor de un gen *PDC1*, *PGK*, *TEF1*, o *TEF2* de la célula hospedadora o es idéntico en al menos un 80%, 85%, 90% o 95% a tal promotor. Un terminador especialmente preferido incluye una porción funcional de un terminador de un gen *PDC1* de la célula hospedadora o es idéntico en al menos un 80%, 85%, 90% o 95% a él.

Cuando se introducen múltiples genes *LDH* exógenos en la célula hospedadora, es posible que los diferentes genes *LDH* estén bajo control de diferentes tipos de promotores y/o terminadores.

El gen *LDH* exógeno se puede integrar de manera aleatoria en el genoma de la célula hospedadora o insertarlo en una o más localizaciones seleccionadas como objetivo. Los ejemplos de localizaciones seleccionadas como objetivo incluyen el locus de un gen que se deleciona o se altera de manera deseable, tal como el de un gen *PDC1*, un gen de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, un gen de glicerol 3-fosfatasa, un gen de dihidroxiacetona fosfato fosfatasa o un gen de glicerol deshidrogenasa. El casete del gen *LDH* exógeno puede encontrarse en una construcción para la delección o alteración de un gen de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, glicerol-3-fosfatasa, dihidroxiacetona fosfato fosfatasa o glicerol deshidrogenasa, y de esa manera se inserta en el locus de tal gen de manera simultánea con la delección o alteración del mismo.

Los métodos para transformar una célula de levadura para introducir un casete de gen *LDH* exógeno se describen en los documentos WO 99/14335, WO 00/71738, WO 02/42471, WO 03/102201, WO 03/102152 y WO 03/049525. Tales métodos son aplicables a esta invención.

La célula también se puede modificar para permitir que produzca otro u otros ácidos orgánicos. Por ejemplo, la célula se puede transformar con un casete de gen exógeno que codifica una enzima beta-alanina/piruvato aminotransferasa funcional, lo que permite que la célula produzca ácido 3-hidroxi propiónico. Los métodos para llevarlo a cabo se describen en el documento WO 2005/118719.

La célula de levadura modificada genéticamente usada en la invención puede incluir modificaciones genéticas adicionales que proporcionan una o más propiedades deseadas a las células.

Una modificación adicional de interés particular en ciertas realizaciones incluye una delección o alteración de gen(es) de piruvato descarboxilasa. Esto reduce la capacidad de la célula de producir etanol, lo cual es especialmente deseable en casos en los que el producto deseado es un ácido orgánico, tal como lactato. Si la célula hospedadora contiene múltiples genes *PDC*, se prefiere especialmente deleccionar o alterar todos los genes *PDC*, aunque es posible deleccionar menos de la totalidad de tales genes *PDC*. La delección de *PDC* se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos análogos a los descritos en los documentos WO 99/14335, WO 02/42471, WO 03/049525, WO 03/102152 y WO 03/102201. La delección de *PDC* también se puede llevar a cabo con la inserción simultánea de un casete de gen *LDH* u otro casete de gen estructural o de marcador de selección. En un método de interés particular, (1) se clonan las secuencias no contiguas del locus de el/los gen(es) *PDC*, (2) se produce una construcción que contiene las secuencias no contiguas, y (3) la célula hospedadora se transforma con la construcción. Un evento de recombinación homóloga da como resultado una delección o alteración del gen *PDC* funcional en una porción de los transformantes. Esto se puede repetir, si es necesario, para deleccionar o alterar múltiples genes o alelos de *PDC*. En ciertas especies de levadura, tales como *I. orientalis*, existen múltiples genes o alelos de *PDC* que son muy homólogos. Se ha descubierto que en al menos algunos casos, se pueden usar secuencias no contiguas tomadas

del locus de cada gen o alelo en la construcción para deletar o alterar ambos genes o alelos de *PDC*. La construcción usada para alterar el/los gen(es) *PDC* puede incluir uno o más casetes de marcador funcional o gen estructural insertados en posición posterior a la porción flanqueante de 5' del gen *PDC* nativo y en posición anterior a las porciones flanqueantes de 3' del gen *PDC* nativo. Esta aproximación permite la delección del gen *PDC* y la inserción del casete de gen funcional en una única etapa de transformación.

Otra modificación adicional de interés particular es una (o más) que confiere individualmente o colectivamente a la célula la capacidad de fermentar carbohidratos de pentosa hasta productos de fermentación deseables. Entre este último tipo de modificaciones están (1) la inserción de un gen de xilosa isomerasa funcional, (2) una delección o alteración de un gen nativo que produce una enzima que cataliza la conversión de xilosa en xilitol, (3) una delección o alteración de un gen de xilitol deshidrogenasa funcional y/o (4) las modificaciones que provocan que la célula sobreexpresa una xiluloquinasa funcional. Los métodos para introducir esas modificaciones en las células de levadura se describen, por ejemplo, en el documento WO 04/099381. Los métodos adecuados para insertar un gen de xilosa isomerasa funcional, deletar o alterar un gen nativo que produce una enzima que cataliza la conversión de xilosa en xilitol, deletar o alterar un gen de xilitol deshidrogenasa funcional modificando la célula para sobreexpresar una xiluloquinasa funcional se describen, por ejemplo, en el documento WO 04/099381.

Otra modificación adicional de interés particular en las células que producen lactato útiles en la invención incluye una delección o alteración de al menos un gen de L- o D-lactato:ferricitocromo c oxidoreductasa.

En general, la célula usada en la invención se caracteriza por una capacidad reducida de sintetizar glicerol. Un método útil para determinar la capacidad de una célula de sintetizar glicerol es cultivar la célula en las condiciones microaerobias estándar descritas anteriormente. Se usa un medio de fermentación acuoso definido, que contiene al inicio del cultivo 5 g/L de sulfato de amonio, 3 g/L de fosfato monopotásico, 0,5 g/L de sulfato magnésico, oligoelementos, vitaminas y 150 g/L de glucosa. El pH se ajusta a 3,5 al inicio del cultivo. Se permite que el pH oscile libremente durante el cultivo, pero se tampona el medio si es necesario para impedir que el pH caiga por debajo de 3,0 o se eleve por encima de 7,0 durante el cultivo. El medio de fermentación se inocula con suficientes células de levadura que son el objeto de la determinación para producir una  $DO_{600}$  de 1,0. La temperatura de cultivo es 30 °C. El cultivo se continúa hasta que la concentración de glucosa se reduce hasta 5 g/L, pero no continúa durante más de 120 horas. Durante el cultivo, se seleccionan las condiciones de ventilación y agitación para producir una tasa de consumo de oxígeno de  $5,0 \pm 1,0$  mmol/L/hr. En estas condiciones estándar, las células usadas en la invención no producen en general más de 2,0 g/L de glicerol. Más en general, no producen más de 0,6 g/L de glicerol en estas condiciones, y en la mayoría de casos no producen más de 0,2 g/L de glicerol en estas condiciones. Las células preferidas también producen, en estas condiciones microaerobias estándar, al menos 10 g/L de al menos un producto de fermentación deseable, tal como etanol o un ácido orgánico tal como lactato. Las células producen más preferiblemente al menos 40 y especialmente al menos 50 g/L del producto de fermentación deseado en estas condiciones.

La célula se puede cultivar en las condiciones microaerobias estándar descritas anteriormente o en cualquier otro conjunto útil de condiciones de fermentación, para producir uno o más productos de fermentación deseables. El etanol es un ejemplo de un producto de fermentación que producen de manera natural muchas especies de levaduras. Como se discutió anteriormente, las células se pueden modificar para permitir que produzcan otros productos de fermentación deseables, que incluyen ácidos orgánicos tales como lactato o ácido 3-hidroxi propiónico. Las células se pueden modificar para producir también otros productos de fermentación, que incluyen otros ácidos u otros productos que no son ácidos.

En el proceso de fermentación de la invención, se cultiva la célula en un medio de fermentación que incluye una fuente de carbono que es fermentable por la célula transformada. La fuente de carbono puede ser un carbohidrato de hexosa tal como glucosa, o un oligómero u otro polímero de glucosa tal como glicano, maltosa, maltotriosa o isomaltotriosa. La fuente de carbono puede ser otro carbohidrato de hexosa, del cual son ejemplos panosa, fructosa, fructosa y sus oligómeros y polímeros respectivos. Si la célula tiene de manera nativa o se modifica para conferir la capacidad de fermentar carbohidratos de pentosa, la fuente de carbono puede incluir un carbohidrato de pentosa tal como xilosa, o un oligómero o polímero de xilosa tal como xilano. Tales carbohidratos de pentosa son de manera adecuada hidrolizados de una biomasa que contiene hemicelulosa. En el caso de carbohidratos oligoméricos, puede ser necesario añadir enzimas al caldo de fermentación para digerirlos hasta el carbohidrato monomérico correspondiente para la fermentación con la célula.

El medio contendrá en general nutrientes según los necesite la célula particular, lo que incluye una fuente de nitrógeno (tal como aminoácidos, proteínas, fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como amoniaco o sales de amonio, y similares), y diversas vitaminas, minerales y similares. Se puede usar un medio denominado "complejo" o un medio denominado "definido".

Otras condiciones de fermentación, tales como la temperatura, la densidad celular, la selección de sustrato(s), la selección de nutrientes, y similares no se consideran críticas para la invención, y se seleccionan en general para proporcionar un proceso económico. Las temperaturas durante la fase de crecimiento y la fase de producción pueden oscilar desde una temperatura superior a la temperatura de congelación del medio hasta alrededor de 50 °C, aunque esto depende hasta cierto punto de la capacidad de la cepa de tolerar las temperaturas elevadas. Una

temperatura preferida, en particular durante la fase de producción, es de alrededor de 30-45 °C.

5 Durante la fase de producción, la concentración de células en el medio de fermentación está en general en el intervalo de 0,1 a 20, preferiblemente de 0,1 a 5, aún más preferiblemente de 1 a 3 g de células secas/litro de medio de fermentación. La fermentación se puede llevar a cabo de manera aerobia, microaerobia, o anaerobia. Si se desea, se puede usar la tasa de consumo de oxígeno como control del proceso, como se describió en el documento WO 03/102200. Las células usadas en la invención pueden comportarse especialmente bien cuando se cultivan en condiciones microaerobias, caracterizadas por una tasa de consumo de oxígeno de 4 a 12, especialmente de 5 a 10, mmol/L/hr.

10 En los casos preferidos en los que la célula produce un ácido orgánico tal como lactato, el medio se puede tamponar durante la fase de producción de la fermentación de forma que el pH se mantiene en un intervalo de alrededor de 3,5 a alrededor de 9,0, o de alrededor de 4,5 a alrededor de 7,0. Los agentes tamponadores adecuados son materiales básicos que neutralizan el ácido a medida que se forma, e incluyen, por ejemplo, hidróxido cálcico, carbonato cálcico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato potásico, carbonato sódico, carbonato amónico, amoniaco, hidróxido amónico y similares. En general, los agentes tamponadores que se han usado en los procesos de fermentación convencionales también son adecuados en la presente memoria.

15 En una fermentación tamponada, los productos de fermentación ácidos se neutralizan hasta la sal correspondiente a medida que se forman. La recuperación del ácido, por lo tanto, implica regenerar el ácido libre. Esto se realiza en general eliminando las células y acidificando el caldo de fermentación con un ácido fuerte tal como ácido sulfúrico. Se forma un producto secundario salino (yeso en el caso en el que una sal cálcica sea el agente neutralizante y ácido sulfúrico sea el agente acidulante), que se separa del caldo. El ácido se recupera después del caldo por medio de técnicas tales como extracción líquido-líquido, destilación, absorción, etc., tal como se describen en T.B. Vickroy, Vol. 3, capítulo 38 de *Comprehensive Biotechnology*, (ed. M. Moo-Young), Pergamon, Oxford, 1985; R. Datta, et al., FEMS Microbiol. Rev., 1995, 16:221-231; patentes de EE.UU. N°s 4.275.234, 4.771.001, 5.132.456, 5.420.304, 5.510.526, 5.641.406, y 5.831.122, y el documento WO 93/00440.

25 De manera alternativa, se puede permitir que el pH del medio de fermentación caiga durante el cultivo desde un pH de partida que está por encima del pKa del producto ácido, en general 5,5 o más, hasta o por debajo del pKa del producto de fermentación ácido, tal como en el intervalo de alrededor de 1,5 a alrededor de 3,5, en el intervalo de alrededor de 1,5 a alrededor de 3,0, o en el intervalo de alrededor de 1,5 a alrededor de 2,5.

30 También es posible llevar a cabo la fermentación para producir un producto ácido ajustando el pH del caldo de fermentación a o por debajo del pKa del producto ácido antes o al inicio del proceso de fermentación. El pH se puede mantener a continuación a o por debajo del pKa del producto ácido a lo largo del cultivo, o se puede dejar incrementar por encima del pKa del ácido a medida que se desarrolla la fermentación. En este último caso, el pH se mantiene preferiblemente dentro del intervalo de alrededor de 1,5 a alrededor de 3,5, en el intervalo de alrededor de 1,5 a alrededor de 3,2, o en el intervalo de alrededor de 2,0 a alrededor de 3,0.

35 La célula usada en la invención tiene una capacidad muy reducida de producir glicerol en muchas condiciones de fermentación. La capacidad reducida de la célula de producir glicerol se manifiesta por rendimientos de glicerol bajos. Las células metabolizan en general menos del 2% en peso de la fuente de carbono que se consume hasta glicerol. En la mayoría de casos, el rendimiento de glicerol es menor del 1% o incluso menor del 0,1%, respecto del peso de la fuente de carbono que se consume en el cultivo. Preferiblemente, la célula metaboliza al menos un 40%, tal como al menos un 50, 60, 70, 80 o 85%, de la fuente de carbono que se consume hasta el producto de fermentación deseado.

40 Se ha descubierto que las células útiles en la invención exhiben una buena capacidad de crecer en condiciones de fermentación. Esto es sorprendente, debido a los diversos usos en la célula del glicerol y al papel que se cree que desempeña el glicerol en el equilibrio de NADH/NAD<sup>+</sup> en las células de levadura de tipo natural. Dentro del alcance de la invención está añadir glicerol al medio de fermentación para compensar la capacidad disminuida de la célula de producir glicerol por sí misma.

45 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, pero no pretenden limitar el alcance de la misma. El Ejemplo 7 es según la invención. Todas las partes y porcentajes están en peso, a menos que se indique de otra manera.

50 **Ejemplo 1A: Mutagénesis de la cepa CD607 de *K. marxianus* y selección de la cepa mutante (CD853) que tiene resistencia a ácido glicólico.**

La cepa CD607 de *K. marxianus* se describe en el Ejemplo 3D del documento WO 03/102152. Esta cepa tiene una delección de su gen de piruvato descarboxilasa y una inserción de un gen de lactato deshidrogenasa exógeno en ese locus. Las células de la cepa CD607 se someten a mutagénesis por medio de exposición a luz ultravioleta.

55 Las células de una placa nueva YP (extracto de levadura más peptona) + 20 g/L de glucosa se resuspenden en 2 mL de levadura-peptona + 50 g/L de glucosa hasta una DO<sub>600</sub> aproximada de 6. Se pipetea diez alícuotas de 125 µl de esta suspensión celular en diez pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos de 300 µl. La placa de

microtitulación se expone a 12.500  $\mu$ Julios/cm<sup>2</sup> de luz UV para destruir un 90-99% de las células. La placa de microtitulación se incuba después en la oscuridad durante la noche a 30 °C con agitación (225 rpm) para permitir que las células se recuperen antes de colocarlas en placas de selección.

5 Después se colocan 100  $\mu$ l de las suspensiones de células tratadas con UV en una placa de agar patata-dextrosa (PDA) + 15 g/L de ácido glicólico para seleccionar las cepas resistentes a ácido glicólico. Estas placas se incuban a 30 °C durante varios días hasta que aparecen colonias. Se aísla una colonia individual para su análisis adicional.

10 Aproximadamente  $2 \times 10^8$  de las células mutagenizadas se colocan en placas PDA que contienen 15 g/L de ácido glicólico y se incuban a 30 °C. Las colonias que crecen en estas placas se cultivan durante la noche en matraces de agitación con deflectores a 30 °C y agitación de 225 rpm en YP (levadura-peptona) + 100 g/L de glucosa sin tampón. Los matraces de producción se inoculan después con 2 g/L de peso seco de células de estos matraces de agitación. Los matraces de producción se cultivan a 30 °C y agitación de 70 rpm en YP + 50 g/L de glucosa. Se extraen muestras periódicamente para medir la glucosa, el lactato, el etanol y el piruvato mediante HPLC con el uso de métodos como los descritos en el Ejemplo 1M del documento WO 03/102201. Una cepa que produce alrededor de 26 g/L de lactato después de 88 horas se denomina cepa CD635. La cepa CD635 es capaz de crecer con lactato como única fuente de carbono.

15 Las células de la cepa CD635 se someten a una etapa de mutagénesis adicional como se describió anteriormente. Las células mutagenizadas resultantes se seleccionan en función de las colonias que son capaces de crecer con PDA que contiene 25 g/L de ácido glicólico. Las colonias que son resistentes a ácido glicólico se cultivan por separado durante la noche en YP + 100 g/L de glucosa en matraces de agitación a 30 °C y agitación de 250 rpm. Se recoge la biomasa mediante centrifugación y se inoculan 2 g/L de peso seco de células en 50 mL de YP + 50 g/L de glucosa en un matraz de agitación con deflectores. Los matraces se cultivan a 30 °C y agitación de 250 rpm durante aproximadamente 92 horas. Un mutante que produce títulos finales de lactato significativamente mayores, en comparación con las cepas originales CD607 y CD635, se denomina cepa CD853.

20 La cepa CD853 es incapaz de crecer con lactato como única fuente de carbono, lo que sugiere que el gen nativo de L-lactato:ferricitocromo c oxidorreductasa (*KmCYB2*) ha pasado a ser no funcional en este mutante. Por lo tanto, la región codificante de *KmCYB2* más ~500 pb antes y después de la región codificante de *KmCYB2* se amplifica a partir de esta cepa, mediante el uso de PCR con la enzima FailSafe de fidelidad elevada y ADN genómico como molde. El producto de PCR resultante de ~2,75 kpb se purifica por medio de purificación en columna de Qiagen y se secuencian a lo largo de toda la región codificante de *KmCYB2*. Se descubre que la cepa CD853 tiene una inserción de cuatro bases en la posición del aminoácido 62 del gen *KmCYB2*, que provoca una mutación por desplazamiento del marco de lectura, lo que da como resultado un codón de parada en la posición del aminoácido 76 y trunca la proteína.

#### Ejemplo 1B: Construcción de los vectores de delección de *GPD1F* pBH158 (Fig. 1) y pBH159 (Fig. 2).

35 Un plásmido denominado pVR29 (descrito en el Ejemplo 1C y la Figura 4 del documento WO 03/102152) contiene el gen de resistencia a kanamicina de Tn903 (gen G418) bajo control de un promotor de piruvato descarboxilasa y un terminador de *GAL10*. El plásmido pVR29 se digiere con *MluI* y *PstI*, y el fragmento de 5,1 kpb que contiene el casete del gen G418 así obtenido se purifica en gel y se desfosforila. Se amplifica una región de 1,2 kpb de ADN en posición anterior al gen de GPD de *K. marxianus* (*KmGPD1F*) mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 14 y SEQ. ID. N° 15, con el ADN genómico de *K. marxianus* como molde. El producto de PCR se purifica en gel, se digiere con *MluI* y *PstI*, y se liga en el fragmento de 5,1 kpb del plásmido pVR29 para producir un plásmido denominado pBH158 (Fig. 1). El plásmido pBH158 contiene, por orden de transcripción, el flanco en posición anterior de 1,2 kpb del gen *KmGPD1F* y el casete de expresión de G418.

45 Para el segundo vector de delección, se digiere el plásmido pVR29 con *NgoMIV* y *AatII*, y se purifica en gel y se desfosforila un fragmento de 4,7 kpb que contiene el casete de expresión de G418. Una región de 0,7 kpb de ADN en posición posterior del gen *KmGPD1F* se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 16 y SEQ. ID. N° 17, de nuevo mediante el uso del ADN genómico de *K. marxianus* como molde. El producto de PCR se purifica en gel, se digiere con *NgoMIV* y *AatII*, y se liga en el fragmento de 4,7 kpb de pVR29 para producir un plásmido denominado pBH159 (Fig. 2). El plásmido pBH159 contiene, por orden de transcripción, el casete de expresión de G418 y el flanco en posición posterior de 0,7 kpb del gen *KmGPD1F*.

50 Ejemplo 1C: Transformación de la cepa CD853 (Ej. 1A) con los plásmidos pBH158 y pBH159 (Ej. 1B, Figs. 1 y 2) para producir un transformante (cepa CD1606) que tiene un gen *LDH* exógeno, una delección de un gen *PDC* nativo, un gen *CYB2* nativo alterado y un gen *GPD1F* nativo delecionado.

55 El plásmido pBH158 se digiere con *MluI* y *HindIII*. Estas enzimas de restricción cortan el plásmido para producir un fragmento de 2,6 kpb que contiene el flanco en posición anterior de 1,2 kpb del gen *KmGPD1F* y parte del casete de expresión de G418. Este fragmento se aísla de un gel de agarosa. El plásmido pBH159 se digiere con *XhoI* y *NgoMIV*. Estas enzimas de restricción cortan el plásmido para producir un fragmento de 2,0 kpb que contiene una porción del casete de expresión de G418 y el flanco en posición posterior de 0,7 kpb del gen *KmGPD1F*. Este fragmento se aísla de un gel de agarosa. Los dos fragmentos aislados contienen juntos el casete de expresión de

G418 completo con cierta duplicación en los extremos de los fragmentos.

La cepa CD853 se cultiva durante la noche en YP + 60 g/L de glucosa + MES 0,2 M + 1% de etanol, pH 6,5, y se somete a electroporación de manera simultánea con el fragmento de 2,6 kpb del plásmido pBH158 y el fragmento de 2,0 kpb de pBH159. Los transformantes se seleccionan en placas de YP + 20 g/L de glucosa + 300 µg/mL de G418 a 30 °C después de 2 días de cultivo. Se recogen 15 transformantes, se vuelven a sembrar en placas de YP + 20 g/L de glucosa + G418 y se cultivan durante la noche. Solamente las células que se han cotransformado con ambos fragmentos y en las que ambos fragmentos se han integrado de manera homóloga en el locus de *KmGPD1F* serán resistentes a G418.

La delección del gen *KmGPD1F* se verifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 18 y SEQ. ID. N° 19. Siete transformantes exhiben una única banda de 3,4 kpb mediante PCR, lo que indica que el gen *KmGPD1F* está delecionado en esos transformantes. Uno de estos transformantes se denomina cepa CD1606.

#### **Ejemplo 2A: Construcción de los vectores de delección del gen *GPP* pBH160 (Fig. 3) y pBH161 (Fig. 4)**

El plásmido pVR29 se digiere con *MluI* y *KpnI*, y el fragmento de 5,1 kpb que contiene el casete del gen G418 así obtenido se purifica en gel y se desfosforila. Una región de 0,9 kpb de ADN inmediatamente en posición anterior del gen de *GPP* nativo (gen *KmHOR2*) se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 20 y SEQ. ID. N° 21, mediante el uso del ADN genómico de *K. marxianus* como molde. El producto de PCR se purifica en gel, se digiere con *MluI* y *KpnI*, y se liga en el fragmento de 5,1 kpb del plásmido pVR29 para producir un plásmido denominado pBH160 (Fig. 3). El plásmido pBH160 contiene, por orden de transcripción, el flanco en posición anterior de 0,9 kpb del gen *KmHOR2* y el casete de expresión de G418.

El plásmido pVR29 se digiere con *NgoMIV* y *SpeI*, y un fragmento de 4,7 kpb que contiene el casete de expresión de G418 se purifica en gel y se desfosforila. Una región de 0,8 kpb de ADN inmediatamente en posición posterior del gen *KmHOR2* se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 22 y SEQ. ID. N° 23, mediante el uso del ADN genómico de *K. marxianus* como molde. El producto de PCR se purifica en gel, se digiere con *NgoMIV* y *SpeI*, y se liga en el fragmento de 4,7 kpb de pVR29 para producir un plásmido denominado pBH161 (Fig. 4). El plásmido pBH161 contiene, por orden de transcripción, el casete de expresión de G418 y el flanco en posición posterior de 0,8 kpb del gen *KmHOR2*.

#### **Ejemplo 2B: Transformación de la cepa CD853 (Ej. 1A) con los plásmidos pBH160 y pBH161 (Ej. 2A, Figs. 3 y 4) para producir un transformante (cepa CD1608) que tiene un gen *LDH* exógeno, una delección de un gen *PDC* nativo, un gen *CYB2* nativo alterado y un gen *GPP* nativo delecionado.**

El plásmido pBH160 se digiere con *MluI* y *HindIII*. Estas enzimas de restricción cortan el plásmido para producir un fragmento de 2,3 kpb que contiene el flanco en posición anterior de 0,9 kpb del gen de *GPP* de *K. marxianus* (*KmHOR2*) y parte del casete de expresión de G418. Este fragmento se aísla de un gel de agarosa. El plásmido pBH161 se digiere con *XhoI* y *NgoMIV*. Estas enzimas de restricción cortan el plásmido para producir un fragmento de 2,0 kpb que contiene el flanco en posición anterior de 0,8 kpb del gen *KmHOR2* y parte del casete de expresión de G418. Este fragmento se aísla de un gel de agarosa. Los dos fragmentos aislados contienen juntos el casete de expresión de G418 completo con cierta duplicación en los extremos de los fragmentos.

La cepa CD853 se cultiva durante la noche en YP + 60 g/L de glucosa + MES 0,2 M + 1% de etanol, pH 6,5, y después se somete a electroporación con el fragmento de 2,3 kpb del plásmido pBH160 y el fragmento de 2,0 kpb del plásmido pBH161. Los transformantes se seleccionan en placas de YP + 20 g/L de glucosa + 300 µg/mL de G418 a 30 °C después de 2 días de cultivo. Se vuelven a sembrar 15 transformantes en placas de YP + 20 g/L de glucosa + 300 µg/mL de G418 y se cultivan durante la noche. Todos los transformantes crecen en este medio. Solamente las células que se han cotransformado con ambos fragmentos y en las que ambos fragmentos se han integrado de manera homóloga en el locus de *KmHOR2* serán resistentes a G418.

La delección del gen *KmHOR2* se verifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 20 y SEQ. ID. N° 21. Tres transformantes producen una única banda de 3,8 kpb, lo que es indicativo de la delección del gen *KmHOR2*. Uno de estos transformantes se denomina cepa CD1608.

#### **Ejemplo 3: Cultivo discontinuo microaerobio de las cepas CD853 (Ej. 1A), CD1606 (Ej. 1C) y CD1608 (Ej. 2B).**

Las cepas CD853, CD1606 y CD1608 se cultivan por separado en condiciones microaerobias. Se llevan a cabo fermentaciones por duplicado en los casos de las cepas CD1606 y CD1608. En cada caso, se usa un reactor de cultivo discontinuo de una etapa. El medio de fermentación es un medio definido que incluye sulfato de amonio, fosfato monopotásico y sulfato magnésico, oligoelementos, vitaminas, agente antiespumante, y alrededor de 90 g/L de glucosa. El pH del medio se ajusta a alrededor de 3,0 mediante la adición de hidróxido potásico. El medio se ajusta a 30 °C y se inocula con 1 mL de células. Las células se cultivan a 30 °C con agitación y en condiciones de ventilación que conducen a una tasa de consumo de oxígeno de 5-6 mmol/L/hr. La tasa de consumo de oxígeno se determina según los métodos descritos en el documento WO 03/102.200.

Se extraen periódicamente muestras del caldo de fermentación y se ensaya el contenido de lactato, acetato, glicerol y piruvato. Se mide la producción de dióxido de carbono determinando el contenido de dióxido de carbono de los gases extraídos del reactor.

5 La cepa CD853 (que no es un ejemplo de la invención) produce lactato a una velocidad de 0,85 g/L-hr en las primeras etapas de la fermentación, hasta que el título de lactato es de aproximadamente 20 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 70%. Tras eso, la producción de lactato se ralentiza hasta alrededor de 0,76 g/L-hr, y el rendimiento de lactato cae ligeramente. La producción para esta cepa se detiene tras 86 horas, en cuyo momento el caldo de fermentación contiene 11 g/L de glucosa. El título de lactato es 59 g/L. La velocidad global de producción de lactato es 0,65 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 70%. Los rendimientos de piruvato, acetato, glicerol y dióxido de carbono para la cepa CD853 son del 0,6%, 0%, 5,1% y 14%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 6,4%.

15 La cepa CD1606 produce lactato a una velocidad de 0,77-0,84 g/L-hr en las primeras etapas de la fermentación, hasta que el título de lactato es de aproximadamente 20 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 72-80%. Tras eso, la producción de lactato se ralentiza hasta alrededor de 0,39 - 0,41 g/L-hr, y el rendimiento de lactato cae ligeramente. La producción para esta cepa se detiene tras 137 horas, en cuyo momento el caldo de fermentación contiene 14-19 g/L de glucosa. El título de lactato es 43-45 g/L. La velocidad global de producción de lactato es 0,32 - 0,34 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 60-63%. Los rendimientos de piruvato, acetato, glicerol y dióxido de carbono para la cepa CD1606 son del 0,1%, 0,5%, 0% y 26-29%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 7,9%. Estos resultados muestran que la delección del gen *KmGPD1F* nativo es eficaz para alterar la capacidad de la célula de producir glicerol. Sorprendentemente, la delección de este gen (y la carencia resultante de producción de glicerol) tiene poco o ningún efecto sobre el crecimiento celular.

25 La cepa CD1608 produce lactato a una velocidad de 0,66 g/L-hr en las primeras etapas de la fermentación, hasta que el título de lactato es de aproximadamente 20 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 70-75%. Tras eso, la producción de lactato se ralentiza hasta alrededor de 0,37 g/L-hr, y el rendimiento de lactato cae ligeramente. La producción para esta cepa se detiene tras 137 horas, en cuyo momento el caldo de fermentación contiene 19 g/L de glucosa. El título de lactato es 42 g/L. La velocidad global de producción de lactato es 0,31 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 59-60%. Los rendimientos de piruvato, acetato, glicerol y dióxido de carbono para la cepa CD1608 son del 0,0 - 0,1%, 0,8%, 0% y 26-28%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 7,9-8,2%. Estos resultados muestran que la delección del gen *KmHOR2* nativo también es eficaz para alterar la capacidad de la célula de producir glicerol. De nuevo, la delección de este gen (y la carencia resultante de producción de glicerol) tiene poco o ningún efecto sobre el crecimiento celular.

#### **Ejemplo 4A: Clonación del gen *GPD1* nativo de *I. orientalis* junto con la región flanqueante en posición anterior y posterior.**

35 Se alinean los genes de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa conocidos de varias especies de levaduras (*S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica*, *P. jadinii*, *D. hansenii* y *C. glabrata*) y se identifican las regiones que están muy conservadas entre los diversos genes. Se diseñaron dos grupos de cebadores degenerados en estas regiones de homología elevada. Estos grupos se identifican como SEQ. ID. N° 24 y SEQ. ID. N° 25, y SEQ. ID. N° 26 y SEQ. ID. N° 27, respectivamente. Se lleva a cabo una PCR mediante el uso del primer grupo de cebadores y ADN genómico de *I. orientalis* como molde, y se obtiene un producto de ~200 pb como se esperaba. Se lleva a cabo de nuevo una PCR mediante el uso del segundo grupo de cebadores y ADN genómico de *I. orientalis* como molde, y se obtiene un producto de ~400 pb como se esperaba. Los dos productos de PCR se purifican en gel y se secuencian mediante el uso de los mismos cebadores. Mediante el uso de la secuencia parcial así obtenida, se diseñan cebadores para el desplazamiento por el genoma. El desplazamiento por el genoma se lleva a cabo mediante el uso del kit Genome Walking de BD Clontech según las instrucciones del fabricante, mediante el uso de cebadores de PCR primarios identificados como SEQ. ID. N° 28 y SEQ. ID. N° 29 y los cebadores de PCR anidada identificados como SEQ. ID. N° 30 y SEQ. ID. N° 31. Las secuencias obtenidas de ambos desplazamientos en posición anterior y posterior se alinean y se combinan con la secuencia parcial obtenida previamente para construir el gen de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de *I. orientalis*.

50 Ejemplo 4B: Construcción de un plásmido (pMM28, Fig. 5) que contiene el casete del gen *KmCYB2* entre secuencias de repeticiones directas de *K. thermotolerans*.

El casete del gen *CYB2* de *K. marxianus* (*KmCYB2*) completo, que incluye las regiones del promotor y del terminador, se amplifica mediante PCR a partir del ADN genómico de una cepa de *K. marxianus* de tipo natural denominada CD21, con la introducción de los sitios de restricción *BamHI* y *Sall*, mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 32 y SEQ. ID. N° 33. El producto de PCR se liga con un vector comercial denominado pUC18 (de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.) que se digiere con *BamHI* y *Sall*. El plásmido resultante se denomina pMM25.

Una secuencia de 705 pb identificada como SEQ. ID. N° 34 se amplifica mediante PCR a partir del ADN genómico de *K. thermotolerans*, con la introducción de los sitios de restricción *SphI* y *Sall*, mediante el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 35 y SEQ. ID. N° 36. Esta secuencia de *K. thermotolerans* no codifica ninguna

proteína activa. El plásmido pMM25 se digiere con *SphI* y *Sall* y la secuencia de *K. thermotolerans* se liga a él en posición anterior (5') al casete de *KmCYB2* para formar un plásmido denominado pMM27.

Una secuencia idéntica de *K. thermotolerans* se amplifica mediante PCR con la adición de los sitios de restricción *BamHI* y *XmaI*, mediante el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 37 y SEQ. ID. N° 38. El plásmido pMM27 se digiere con *BamHI* y *XmaI* y la secuencia de *K. thermotolerans* se liga a él en posición posterior (3') del casete de *KmCYB2* para formar un plásmido denominado pMM28 (Fig. 5). El plásmido pMM28 contiene el casete de *KmCYB2* flanqueado por secuencias de repeticiones directas de *K. thermotolerans*, ambas orientadas en la misma dirección.

**Ejemplo 4C: Construcción de un plásmido (pMI321, Fig. 7) que contiene un casete de gen de higromicina y un casete de gen de *LDH* de *L. helveticus*.**

Se obtiene un fragmento de sonda de 920 pb del gen *PGK1* de *C. sonorensis* a partir del ADN genómico de *C. sonorensis* de la misma manera que se describió en el Ejemplo 22 del documento WO 02/042471, mediante el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 39 y SEQ. ID. N° 40. Se aísla el ADN genómico de una cepa de *I. orientalis* en crecimiento y se resuspende en Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM (pH 8) (TE). El ADN genómico de *I. orientalis* se corta con *HindIII*, y se prepara una transferencia de Southern y se hibrida mediante el uso de métodos estándar con el gen *PGK1* de *C. sonorensis* como sonda. Se aíslan fragmentos de un tamaño de ~2 kb del gel de agarosa y se clonan en un plásmido cortado con *HindIII* para generar una biblioteca fraccionada por tamaños, que se transforma en *E. coli*. La hibridación de colonias de la biblioteca fraccionada por tamaños con la sonda de *PGK1* da como resultado el aislamiento de un plásmido que contiene un fragmento *HindIII* con la mayor parte de las secuencias codificantes de la proteína *PGK1* de *I. orientalis* (*IoPGK1*), pero sin la secuencia promotora, tal como se verifica mediante secuenciación.

Se obtienen fragmentos genómicos que contienen la región promotora de *IoPGK1* con una amplificación por PCR mediada por ligadura (Mueller, P.R. y Wold, B. 1989, "In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR." Science 246:780-786). Una mezcla de un ligador identificado como SEQ. ID. N° 41 y un ligador identificado como SEQ. ID. N° 42 se liga al ADN genómico de *I. orientalis* digerido con *HaeIII* con la T4 ADN ligasa (New England BioLabs). Se usan muestras de las mezclas de ligadura como moldes para reacciones de PCR de 50 µl que contienen 0,1 µM de un cebador identificado como SEQ. ID. N° 43 y 1 µM de un cebador identificado como SEQ. ID. N° 44. La mezcla de reacción se calienta a 94 °C durante 3 minutos, y después se añaden 2 U de Dynazyme EXT. Las reacciones se someten a ciclos 30 veces como sigue: 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 68 °C y 2 minutos a 72 °C, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Se usa una muestra diluida de esta primera amplificación mediante PCR como molde en una reacción de PCR anidada (50 µl) que contiene 0,05 µM de un cebador identificado como SEQ. ID. N° 45 y 0,5 µM de un cebador identificado como SEQ. ID. N° 46. La mezcla de reacción se calienta a 94 °C durante 3 minutos, y después se añaden 2 U de Dynazyme EXT. Las reacciones se someten después a ciclos 30 veces como sigue: 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 67 °C y 2 minutos a 72 °C, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Se aísla y se secuencia un fragmento de PCR de ~600 pb. Los cebadores anidados identificados como SEQ. ID. N° 47 y SEQ. ID. N° 48 se diseñan y se usan en una amplificación con PCR mediada por ligadura junto con oligonucleótidos identificados como SEQ. ID. N° 49 y SEQ. ID. N° 50 de forma similar a anteriormente, excepto porque se usa ADN de *I. orientalis* digerido con *SspI* y la PCR se lleva a cabo mediante el uso de una temperatura de hibridación de 65 °C.

La región del promotor de *PGK1* de *I. orientalis* se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 51 y SEQ. ID. N° 52 y el ADN genómico de *I. orientalis* como molde. El fragmento se rellena al usar la enzima Klenow, y después se corta con *XbaI*. Un fragmento de 633 pb se aísla en gel y se liga a un fragmento de 4428 pb obtenido digiriendo un plásmido denominado pMI270 (descrito en la Fig. 4 del documento WO 03/049525) con *XhoI*, rellenando el fragmento al usar la enzima Klenow y dNTP 0,1 mM, y digiriendo con *XbaI*. El plásmido pMI270 contiene el gen de higromicina de *E. coli* unido a un promotor de *PGK1* de *C. sonorensis* y un terminador de *GAL10* de *S. cerevisiae*. El plásmido resultante se denomina pMI318 (Fig. 6). El plásmido pMI318 contiene el gen de higromicina de *E. coli* bajo control del promotor de *PGK1* de *I. orientalis* y el terminador de *GAL10* de *S. cerevisiae*.

El promotor de *PGK1* de *I. orientalis* se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 53 y SEQ. ID. N° 54 y el ADN genómico de *I. orientalis* como molde. El fragmento se rellena al usar la enzima Klenow y dNTP 0,1 mM, y después se corta con *NcoI*. Se aísla en gel un fragmento de 633 pb. El plásmido pVR1 (descrito en el documento WO 03/102152, Figura 7) contiene el gen *LDH* de *L. helveticus* bajo control del promotor de *TEF1* de *S. cerevisiae* y el terminador de *CYC1* de *S. cerevisiae*. El plásmido pVR1 se digiere con *XhoI*, se rellena al usar la enzima Klenow, y se corta con *NcoI*. Se liga un fragmento de 7386 pb del plásmido pVR1 en el fragmento del promotor de *IoPGK1* de 633 pb. El plásmido resultante se denomina pMI320. El plásmido pMI320 contiene el gen *LDH* de *L. helveticus* bajo control del promotor de *IoPGK1* y el terminador de *CYC1* de *S. cerevisiae*.

Los plásmidos pMI318 y pMI320 se digieren con *Apal* y *NotI*. Se liga un fragmento de 5008 pb del plásmido pMI318 con un fragmento de 1995 pb del plásmido pMI320 para formar el plásmido pMI321 (Fig. 7).

El gen de higromicina (y su terminador) se colocan en el plásmido pMI321 entre dos copias del promotor de *loPGK1*, que sirven como secuencias de repeticiones directas.

**Ejemplo 4D: Construcción de un plásmido (pMI355, Fig. 8) que tiene el casete del gen de higromicina de *E. coli*, el casete del gen *LDH* de *L. helveticus*, y la región flanqueante de 5' de *loPDC1A*.**

5 Se construye una biblioteca genómica de la cepa de tipo natural de *I. orientalis* de la ATCC PTA-6658 en el vector cósmido SuperCos1 (Stratagene) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las secuencias similares a PDC se amplifican mediante PCR a partir del ADN genómico de la cepa con cebadores denominados SEQ. ID. N° 55 y SEQ. ID. N° 56. Se amplifica un fragmento de 700 pb de un gen *PDC*. La biblioteca genómica se criba mediante el uso de técnicas de hibridación con fragmentos de PCR marcados como sonda como se describió en el documento  
10 WO 03/049525, y los clones de cósmidos que contienen el gen *PDC* se aíslan y secuencian. La región de 5' de *PDC1A* de *I. orientalis* desde 1000 pb hasta 167 pb en posición anterior al inicio del marco de lectura abierto se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 57 y SEQ. ID. N° 58 y el ADN del cósmido de *PDC1A* de *I. orientalis* como molde. El fragmento se corta con *Sall* y *SacI*. Un fragmento de 836 pb se aísla en gel y se liga con un fragmento de 6992 pb obtenido digiriendo el plásmido pMI321 (Fig. 7, Ejemplo 4C) con *Sall* y *SacI*. El plásmido resultante se denomina pMI355 (Fig. 8).  
15

**Ejemplo 4E: Construcción de plásmidos (pMI356 y pMI357 (Fig. 9)) que contienen la región flanqueante de 5' de *loPDC1A*, el casete del gen de higromicina de *E. coli*, el casete del gen *LDH* de *L. helveticus*, y una región flanqueante de 3' de *loPDC1A*.**

20 La región de 3' de *PDC1A* de *I. orientalis* correspondiente a las secuencias desde 524 pb en posición anterior hasta 217 pb en posición posterior del codón de parada de la traducción de *PDC* se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 59 y SEQ. ID. N° 60 y el ADN del cósmido de *PDC1A* de *I. orientalis* (Ejemplo 4D) como molde. El fragmento se corta con *Apal* y *SmaI*. Se aísla en gel un fragmento de 630 pb y se liga a un fragmento de 7809 pb obtenido digiriendo el plásmido pMI355 (Fig. 8, Ej. 4D) con *Apal* y *SmaI*. El plásmido resultante se denomina pMI357 (Fig. 9). Contiene los casetes de higromicina y LDH del plásmido pMI355 entre el flanco de 5' y una porción del flanco de 3' del gen *loPDC1A*.  
25

El plásmido pMI356 se construye de la misma manera, excepto porque se usa una sección diferente de la región de 3' de *PDC1A* de *I. orientalis*.

**Ejemplo 4F: Construcción del plásmido pMI433 (Fig. 10) que contiene la región flanqueante de 5' de *loPDC1A*, un casete del gen *ScMEL5*, el casete del gen *LDH* de *L. helveticus* y la región flanqueante de 3' de *loPDC1A*.**

30 El promotor de *PGK1* de *I. orientalis* se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 61 y SEQ. ID. N° 62 y el ADN genómico de *I. orientalis* como molde. El fragmento se rellena al usar la enzima Klenow y dNTP 0,1 mM, y después se corta con *SphI*. Se aísla en gel un fragmento de 669 pb. Un plásmido denominado pMI233 (descrito en la Fig. 23C del documento WO 03/049525) se corta con *XhoI*. El fragmento se rellena con la enzima Klenow y se corta con *SphI*. Se ligan los fragmentos de 4534 pb y de 669 pb, y el plásmido resultante se denomina pMI319. El plásmido pMI319 contiene el gen *MEL5* de *S. cerevisiae* (*ScMEL5*) y la región promotora de *loPGK1*.  
35

El plásmido pMI319 se corta con *Apal*, los extremos se hacen romos con polimerasa de T4, y se corta con *NotI*. Se aísla en gel un fragmento de 2317 pb. Se liga a un fragmento de 6498 pb obtenido digiriendo el plásmido pMI357 (Ejemplo 4E) con *Sall*, haciendo los extremos romos con la enzima Klenow y después cortando con *NotI*. El plásmido resultante contiene el gen *ScMEL5* (con su terminador nativo) en lugar del gen de higromicina del plásmido pMI357. El plásmido resultante se denomina pMI433 (Fig. 10).  
40

**Ejemplo 4G: Construcción de los plásmidos pMI449 (Fig. 11) y pMI454 (Fig. 12) que contienen la región flanqueante de 5' de *CYB2* de *I. orientalis*, el casete del gen *ScMEL5* entre secuencias de repeticiones directas de *K. thermotolerans* y la región flanqueante de 3' de *CYB2* de *I. orientalis*.**

45 El plásmido pMM28 (Fig. 5, Ej. 4B) se digiere con *BamHI*, se rellena con la enzima Klenow, y se digiere con *Sall*. El fragmento de 4077 pb así obtenido se liga a un fragmento *NotI* (rellenado con la enzima Klenow)-*Sall* de 2317 pb de pMI433 (Fig. 10, Ej. 4F). El plásmido resultante se denomina pMI445.

50 La región flanqueante de 3' del gen de L-lactato:ferricitocromo c oxidorreductasa de *I. orientalis* (*loCYB2A*) (que corresponde a las secuencias de 90 a 676 pb en posición posterior del inicio del marco de lectura abierto) se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 63 y SEQ. ID. N° 64, mediante el uso de un clon de cósmido de *CYB2-2* como molde. El producto de la PCR se digiere con *SacI* y *SmaI*, y el fragmento de 607 pb se liga al fragmento *SacI* - *SmaI* de 6386 pb del plásmido pMI445. El plásmido resultante se denomina pMI448.

55 La región flanqueante de 5' de *loCYB2A* (que corresponde a las secuencias de 913 a 487 pb en posición anterior del inicio del marco de lectura abierto predicho) se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados

como SEQ. ID. N° 65 y SEQ. ID. N° 66, de nuevo mediante el uso del clon de cósmido de *CYB2-2* como molde. El producto de PCR se digiere con *SphI*, y el fragmento de 454 pb se liga al fragmento *SphI* de 6993 pb obtenido digiriendo parcialmente pMI448. El plásmido resultante se denomina pMI449 (Fig. 11).

5 La región flanqueante de 5' de *loCYB2A* (que corresponde a las secuencias de 466 a 7 pb en posición anterior del marco de lectura abierto predicho) se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 67 y SEQ. ID. N° 68, una vez más mediante el uso del clon de cósmido de *CYB2-2* como molde. El producto de PCR se digiere con *SphI*, y el fragmento de 493 pb se liga al fragmento *SphI* de 6993 pb obtenido digiriendo parcialmente el plásmido pMI448. El plásmido resultante se denomina pMI453.

10 La región flanqueante de 3' de *loCYB2A* (que corresponde a las secuencias desde 402 pb en posición anterior hasta 77 pb en posición posterior del codón de parada predicho) se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 69 y SEQ. ID. N° 70, mediante el uso del cósmido de *CYB2-2* como molde. El producto de la PCR se digiere con *Apal* y *SmaI*, y el fragmento de 506 pb se liga al fragmento *Apal* - *SmaI* de 6886 pb del plásmido pMI453. El plásmido resultante se denomina pMI454 (Fig. 12).

15 **Ejemplo 4H: Construcción de un plásmido (pBH165, Fig. 13) que contiene un fragmento en posición anterior del gen *loGPD1*, una primera sección de repeticiones directas de *K. thermotolerans*, un casete del gen *MEL5*, una segunda sección de repeticiones directas de *K. thermotolerans*, y un fragmento en posición posterior del gen *loGPD1*.**

20 El plásmido pMI449 se digiere con *NdeI* y *SbfI* para escindir la homología flanqueante de *CYB2A* de 5'. Un fragmento de 6,8 kpb se purifica en gel y se desfosforila. Un fragmento de 302 pb del gen *loGPD1* del Ejemplo 4A (que corresponde a los pares de bases 1-302 desde el codón de inicio del gen) se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 71 y SEQ. ID. N° 72. El producto de PCR se purifica en gel, se digiere con *NdeI* y *SbfI*, y se liga al fragmento de 6,8 kpb del plásmido pMI449 para producir el plásmido pBH164. El plásmido pBH164 se digiere después con *XmaI* y *EcoRI* para escindir la homología flanqueante de *CYB2A* de 3'. Un fragmento de 6,5 kpb se purifica en gel y se desfosforila. Un fragmento de 346 pb del gen *loGPD1* del Ejemplo 4A (que corresponde a los pares de bases 322-668 desde el codón de inicio) se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 73 y SEQ. ID. N° 74. El producto de PCR se purifica en gel, se digiere con *XmaI* y *EcoRI*, y se liga al fragmento de 6,5 kpb obtenido de pBH164 para producir pBH165 (Fig. 13).

30 El plásmido pBH165 contiene, por orden de transcripción, el fragmento de 302 pb del gen *loGPD1*, una primera sección de repeticiones directas de *K. thermotolerans*, un casete del gen *MEL5*, una segunda sección de repeticiones directas de *K. thermotolerans*, y el fragmento de 346 pb del gen *loGPD1*. Se diseña para la inserción en el locus del gen *loGPD1* nativo (con la alteración del gen), seguido de una eliminación por formación de bucle del casete del gen *MEL5*.

35 **Ejemplo 4I: Generación de un mutante de *I. orientalis* (CD1184) con los genes *loPDC1A* y *loPDC1B* delecionados y el gen *LhLDH* integrado en una etapa transformando la cepa de *I. orientalis* de tipo natural con el plásmido pMI356 (Ej. 4F).**

La cepa de *I. orientalis* de tipo natural de la ATCC PTA-6658 se transforma con el plásmido pMI356 mediante el uso de métodos estándar. Se cultivan las cepas transformadas que crecen en placas de higromicina. Se selecciona un transformante que no produce etanol para un análisis de Southern, que confirma la deleción de ambos alelos de *loPDC1A* y la inserción de al menos una copia del gen *LhLDH*. Esta cepa se denomina CD1184.

40 **Ejemplo 4J: Generación de la cepa mutante de *I. orientalis* (CD1496) transformando sucesivamente la cepa CD1184 (Ej. 4I) con los plásmidos pMI449 (Ej. 4G, Fig. 11) y pMI454 (Ej. 4G, Fig. 12), seguido de mutagénesis.**

45 La cepa CD1184 se transforma con el plásmido pMI449 mediante el uso del método de acetato de litio y los transformantes (colonias azules) se seleccionan basándose en la actividad de melibiosa en placas de YPD X- $\alpha$ -gal. La sustitución del gen *loCYB2A* de la cepa CD1184 se confirma mediante PCR de las colonias y un análisis de Southern en algunos de los transformantes. El marcador *MEL5* se elimina por formación de un bucle de uno de esos transformantes a través de un evento de recombinación homóloga por medio de las secuencias de repeticiones de *K. thermotolerans*, tal como se confirma mediante análisis de Southern. El segundo alelo de *CYB2A* se deleciona después en este transformante mediante el uso del plásmido pMI454. Los transformantes se analizan mediante PCR de las colonias con respecto a la ausencia de un producto de PCR específico de *CYB2A* de 1000 pb. El marcador *MEL5* del plásmido pMI454 se elimina por formación de un bucle de un transformante que tiene una deleción del segundo alelo de *CYB2A* por medio de recombinación como antes. Este transformante se denomina cepa CD1436. La cepa CD1436 tiene una deleción de ambos genes *PDC1* (con la sustitución por un casete del gen *L-LDH* funcional), y una deleción de cada uno de sus dos genes *loCYB2* nativos.

55 La cepa CD1436 se somete a mutagénesis con EMS mediante el uso de las condiciones expuestas en el Ejemplo 1A, excepto porque las condiciones de exposición son 8  $\mu$ L durante 1 hora. Las células mutagenizadas se dejan recuperar durante 6 horas en 200  $\mu$ L de medios de YP + 20 g/L de glucosa, y después se colocan en placas con PDA + 35 g/L de ácido láctico y se incuban durante una semana a 30 °C. Una cepa que produce más lactato y menos glicerol que la cepa CD1436 se denomina cepa CD1496.

**Ejemplo 4K: Transformación de las cepas CD1184 (Ej. 4I) y CD 1496 (Ej. 4J) con el plásmido pBH165 (Ej. 4H, Fig. 13), seguido de eliminación por formación de bucle del marcador de selección para producir las cepas transformantes CD1667 y CD1671, respectivamente, que tienen un único alelo de *GPD1* delecionado.**

5 La cepa CD1184 se cultiva y se transforma con 5 µg del fragmento de 4,4 kpb obtenido digiriendo el plásmido pBH165 con *NdeI* y *EcoRI*. Los transformantes se seleccionan en placas de base nitrogenada para levaduras (YNB) + 2% de melibiosa cubiertas con x-α-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-αD-galactopiranosido). Los transformantes de color azul son visibles después de ~4 días de cultivo a 30 °C. Se recogen ocho transformantes y se colocan en placas para colonias individuales de YP + 20 g/L de glucosa que contienen x-α-gal. Se recoge una única colonia azul para cada transformante y se vuelve a sembrar en placas de YP + 20 g/L de glucosa. Se aísla el ADN genómico de los transformantes. La alteración de un alelo del gen *loGPD1* se verifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 75 y SEQ. ID. N° 76. Cinco transformantes exhiben el producto de ~2 kb esperado. Uno de esos transformantes se denomina cepa CD1655. La alteración de una copia del gen *loGPD1* nativo se verifica adicionalmente mediante PCR con el uso de los cebadores denominados SEQ. ID. N° 77 y SEQ. ID. N° 78.

15 La cepa CD1655 se cultiva durante varias rondas en YP + 100 g/L de glucosa a 30 °C. Una dilución en serie se coloca en placas de YP + 20 g/L de glucosa cubiertas con x-α-gal, y se cultivan durante la noche a 30 °C. Se selecciona una colonia blanca (indicativa de la eliminación por formación de bucle del casete de marcador MEL 5) y se vuelve a sembrar en placas de YP + 20 g/L de glucosa + x-α-gal. Se selecciona una colonia blanca. La alteración de un alelo del gen *loGPD1* nativo se verifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 69 y SEQ. ID. N° 80. Este transformante se denomina cepa CD1667.

20 La cepa CD1496 se transforma de la misma manera. Un transformante que exhibe la banda de ~2 kpb esperada en PCR se denomina cepa CD1657. La alteración de un alelo del gen *loGPD1* nativo se verifica mediante PCR como se describió para la cepa CD1655. La cepa CD1657 se cultiva además durante varias rondas, y se selecciona una colonia que muestra una deleción del casete del gen marcador *MEL5* y se denomina cepa CD1671. La alteración de un alelo del gen *loGPD1* nativo se verifica mediante PCR como antes.

25 **Ejemplo 4L: Transformación de las cepas CD1667 (Ej. 4K) y CD1671 (Ej. 4K) con el plásmido pBH165 (Ej. 4H, Fig. 13) para producir las cepas transformantes CD1688 y CD1690, respectivamente, con ambos alelos de *loGPD1* delecionados.**

30 La cepa CD1667 se transforma con 5 µg del fragmento de 4,4 kpb obtenido digiriendo el plásmido pBH165 con *NdeI* y *EcoRI*. Los transformantes se seleccionan en placas de YNB + 2% de melibiosa cubiertas con x-α-gal. Los transformantes de color azul son visibles después de ~4 días de cultivo a 30 °C. Se recogen diez transformantes y se colocan en placas para colonias individuales de YP + 20 g/L de glucosa que contienen x-α-gal. Se recoge una única colonia azul para cada transformante y se vuelve a sembrar en placas de YP + 20 g/L de glucosa. Se aísla el ADN genómico de los transformantes. La alteración del segundo alelo del gen *loGPD1* se verifica en tres transformantes mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. NO 81 y SEQ. ID. N° 82. Uno de estos transformantes se denomina cepa CD1688.

35 La cepa CD1671 se transforma de la misma manera. La PCR muestra que el segundo alelo del gen *loGPD1* se altera en un transformante, que se denomina cepa CD1690.

**Ejemplo 5: Cultivo discontinuo microaerobio de las cepas CD1184 (Ej. 4I) y CD1688 (Ej. 4L) a una OUR de 5,5-5,6.**

40 Un reactor de cultivo discontinuo de una etapa que contiene un medio definido que incluye sulfato de amonio, fosfato monopotásico y sulfato magnésico, oligoelementos, vitaminas, agente antiespumante, y alrededor de 50 g/L de glucosa se inocula con 1 mL de la cepa CD1688. El pH del medio se ajusta a alrededor de 3,5 antes de añadir las células. El pH del cultivo se deja caer a 3,0 a medida que crecen las células y comienzan a producir ácido láctico. Después, el pH se mantiene a alrededor de 3,0 mediante la adición de hidróxido potásico. Se alimenta glucosa a la fermentación a alrededor de 1-2 g/L/hr hasta que se ha añadido un total de 136,1 g/L de glucosa. Las células se cultivan a 30 °C en condiciones de ventilación que conducen a una tasa de consumo de oxígeno de 5,5-5,6 mmol/L/hr.

45 La cepa CD1688 produce lactato a una velocidad de 1,02 g/L-hr hasta que el título de lactato es aproximadamente 70 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 74%. La producción para esta cepa se detiene tras 77 horas, en cuyo momento el caldo de fermentación contiene 15,3 g/L de glucosa. La velocidad global de producción de lactato es 1,06 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 70%. Los rendimientos de piruvato, glicerol y dióxido de carbono para la cepa CD1688 son 1,9%, 0% y 23,7%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 3,5%.

55 Como comparación, la cepa CD1184 (no es un ejemplo de la invención) se cultiva en condiciones similares. La cepa CD1184 produce lactato a una velocidad de 1,24 g/L-hr hasta que el título de lactato es aproximadamente 70 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 74%. La producción para esta cepa se detiene tras 77 horas, en cuyo momento el caldo de fermentación contiene 15,3 g/L de glucosa. La velocidad global de producción de lactato es 1,06 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 70%. Los rendimientos de piruvato, glicerol y dióxido

de carbono para la cepa CD1184 son 2,1%, 9,3% y 15,9%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 3,2%.

Estos resultados muestran que, en estas condiciones de fermentación, la delección de los genes *loGPD1* nativos impide que la célula produzca cantidades medibles de glicerol. Como antes, la delección de este gen (y la carencia resultante de producción de glicerol) tiene poco o ningún efecto sobre el crecimiento celular.

5 **Ejemplo 6: Cultivo discontinuo microaerobio de las cepas CD1184 (Ej. 4I) y CD1688 (Ej. 4L) a una OUR de 9,9-10.**

10 Las cepas CD1688 y CD1184 se cultivan por separado de la manera general descrita en el Ejemplo 5, excepto porque se seleccionan las condiciones de ventilación para alcanzar una tasa de consumo de oxígeno de 9,9-10,0 mmol/L/hr, y no se alimenta glucosa en el sistema durante el cultivo. Se añaden cortezas de levadura al cultivo de la cepa CD1688.

15 En estas condiciones, la cepa CD1184 produce lactato a una velocidad de 1,87 g/L-hr hasta que el título de lactato es aproximadamente 70 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 73%. La producción para esta cepa se detiene después de 67,5 horas, en cuyo momento la concentración de glucosa en el caldo de fermentación se ha reducido desde 60 g/L hasta 2,1 g/L. La velocidad global de producción de lactato es 1,43 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 70%. Los rendimientos de piruvato, glicerol y dióxido de carbono para la cepa CD1184 son 2,1%, 5,7% y 21,5%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 4,4%.

20 La cepa CD1688 produce lactato a una velocidad de 1,68 g/L-hr hasta que el título de lactato es aproximadamente 70 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 80%. La producción para esta cepa se detiene después de 78 horas, en cuyo momento la concentración de glucosa en el caldo de fermentación se ha reducido desde 53,5 g/L hasta 4,8 g/L. La velocidad global de producción de lactato es 1,26 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 77%. Los rendimientos de piruvato, glicerol y dióxido de carbono para la cepa CD1688 son 1,2%, 0% y 23,2%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 5,95%. Como antes, estos resultados muestran que, en estas condiciones de fermentación, la delección de los genes *loGPD1* nativos impide que la célula produzca cantidades medibles de glicerol y que la delección de este gen (y la carencia resultante de producción de glicerol) no tiene efecto sobre el crecimiento de la célula. Además, la delección de *loGPD1* mejora el rendimiento global de lactato.

25 **Ejemplo 7: Cultivos discontinuos microaerobios de la cepa CD1690 (Ej. 4L) a una OUR de 5-6.**

30 La cepa CD1690 se cultiva de la manera general descrita en el Ejemplo 5, excepto porque las condiciones de ventilación se seleccionan para alcanzar una tasa de consumo de oxígeno de 5,75 mmol/L/hr, y el medio de fermentación es YP + 70 g/L de glucosa.

35 En estas condiciones, la cepa CD1690 produce lactato a una velocidad de 0,66 g/L-hr hasta que el título de lactato es aproximadamente 70 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 78%. La producción para esta cepa se detiene después de 121 horas, en cuyo momento la concentración de glucosa en el caldo de fermentación se ha reducido a 23,8 g/L (de los 127,9 g/L proporcionados al cultivo). La velocidad global de producción de lactato es 0,61 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 77%. Los rendimientos de piruvato, glicerol y dióxido de carbono son 0%, 0% y 31,1%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 2,4%. De nuevo, estos resultados muestran que, en estas condiciones de fermentación, la delección de ambos alelos de *loGPD1* nativos impide que la célula produzca cantidades medibles de glicerol, y tiene poco o ningún efecto sobre el cultivo celular.

40 La cepa CD1690 se cultiva dos veces más de la manera general descrita en el Ejemplo 5 (mediante el uso del medio definido descrito ahí), excepto porque la OUR es 5,2 mmol/L/hr y se añade glicerol al caldo de fermentación. En el primer cultivo se añaden 0,1 g/L de glicerol, y se añaden 1,0 g/L de glicerol en el segundo cultivo.

45 Cuando se añaden 0,1 g/L de glicerol, la cepa CD 1690 produce lactato a una velocidad de 0,74 g/L-hr hasta que el título de lactato es aproximadamente 70 g/L. El rendimiento de lactato en ese punto es de alrededor del 78%. La producción para esta cepa se detiene después de 121 horas, en cuyo momento la concentración de glucosa en el caldo de fermentación se ha reducido a 10,2 g/L (de los 117,8 g/L proporcionados al cultivo). La velocidad global de producción de lactato es 0,68 g/L-hr, y el rendimiento total de lactato es del 76%. Los rendimientos de piruvato, glicerol y dióxido de carbono son 0,2%, 0% y 25,3%, respectivamente. El rendimiento de biomasa es del 4,1%.

Se obtienen resultados muy similares cuando se añaden 1,0 g/L de glicerol.

50 Estos resultados muestran inesperadamente que la adición de glicerol al medio de fermentación tiene poco o ningún efecto sobre la capacidad de estos transformantes de crecer y producir lactato, a pesar de la alteración de la capacidad nativa de las células de producir glicerol.

55 **Ejemplo 8A: Construcción de un plásmido (pTMC61 (Fig. 14)) que contiene la región flanqueante de 5' de *loGPD1*, el casete del gen de higromicina de *E. coli* entre repeticiones directas, y la región flanqueante de 3' de *loGPD1*.**

5 El casete del gen de higromicina se amplifica mediante PCR con el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 83 y SEQ. ID. N° 84, con el plásmido pMI356 (Ej. 4E, véase la Fig. 9) como molde. Las condiciones de la PCR son 95 °C durante 5 minutos (una vez), 30 ciclos de 95 °C (30 segundos), 56 °C (30 segundos) y 72 °C (2 minutos), seguido de un ciclo de 72 °C durante 10 minutos. El producto de PCR resultante se digiere con *SpeI* y *Sall*, y se liga en el plásmido pBH165 (Ej. 4H, Fig. 13), que se ha digerido de forma similar, para producir el plásmido pTMC61 (Fig. 14).

**Ejemplo 8B: Transformación de la cepa de *I. orientalis* de tipo natural seleccionada con el plásmido pBH165 (Ej. 4H, Fig. 13), seguido de eliminación por formación de bucle del marcador de selección para producir la cepa transformante CD2624, que tiene un único alelo de *GPD1* delecionado.**

10 La cepa de *I. orientalis* de tipo natural de la ATCC PTA-6658 se cultiva durante muchas generaciones en un cultivo continuo en un medio que contiene una concentración baja de glucosa y una concentración elevada de ácido láctico. Se aísla una célula que crece bien en estas condiciones y se denomina cepa CD1822. La cepa CD1822 produce etanol y glicerol cuando se cultiva en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono. La cepa CD1822 se cultiva y se transforma con el plásmido pBH165 de la misma manera que se describió en el Ejemplo 4K. Los transformantes se seleccionan en placas de base nitrogenada para levaduras (YNB) + 2% de melibiosa cubiertas con x- $\alpha$ -gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactopiranosido), como se describió en el Ejemplo 4K, y se recoge una colonia azul y se vuelve a sembrar en placas de YP + 20 g/L de glucosa. Se aísla el ADN genómico del transformante, y se analiza con respecto a la integración de la construcción de deleción mediante dos grupos de reacciones de PCR. El primero de estos usó los cebadores denominados SEQ. ID. N° 85 y SEQ. ID. N° 86, y el segundo de estos se llevó a cabo con los cebadores denominados SEQ. ID. N° 87 y SEQ. ID. N° 88. Estos produjeron productos de PCR de 2,0 kpb y 1,4 kpb, respectivamente, lo que indica que se ha alterado uno de los alelos de *GPD1*. Se lleva a cabo una tercera reacción de PCR, mediante el uso de los cebadores denominados SEQ. ID. N° 85 y SEQ. ID. N° 88; esto produce un producto de 0,8 kpb, lo que indica que todavía hay un alelo de *GPD1* inalterado en el transformante. El transformante se denomina cepa CD2624.

25 **Ejemplo 8C: Transformación de la cepa CD2624 (Ej. 8B) con el plásmido pTMC61 (Ej. 8A, Fig. 14) para producir cepas transformantes CD2627, que tienen ambos alelos de *loGPD1* delecionados.**

30 Se lleva a cabo una PCR mediante el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 89 y SEQ. ID. N° 90, con el plásmido pTMC61 como molde. Se obtiene un fragmento de 4,1 kpb, y se usa para transformar la cepa CD2624. Los transformantes se seleccionan con YPD + 300  $\mu$ g/ml de higromicina. Se aísla el ADN genómico de 100 de los transformantes, y se usa como molde en tres grupos de reacciones de PCR. El primero usa los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 91 y SEQ. ID. N° 88, y produce un producto de 1,5 kpb en 30 de los transformantes. Se lleva a cabo una segunda reacción de PCR con ADN genómico de esos 30 transformantes mediante el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 85 y SEQ. ID. N° 92. Diez cepas exhibieron el producto esperado de 2,5 kpb. El ADN genómico de esas diez cepas se analiza después mediante el uso de los cebadores identificados como SEQ. ID. N° 85 y SEQ. ID. N° 88. Dos cepas que no producen un fragmento de 0,8 kpb tienen ambos alelos de *GPD1* alterados. Estas se ensayan con respecto al cultivo en placas de YNB + 2,0% de melibiosa. Una cepa es capaz de crecer, y se denomina cepa CD2627.

**Ejemplo 8D: Cultivo microaerobio de la cepa CD1822, cepa CD2624 (Ejemplo 8B) y cepa CD2627 (Ejemplo 8C).**

40 Las cepas CD1822, CD2624 y CD2627 se cultivan en fermentaciones microaerobias en matraz de agitación por duplicado. Las cepas se cultivan durante la noche en 25 mL de un medio definido que contiene ~100 g/mL de glucosa, a 30 °C y agitación a 250 rpm en matraces con deflectores de 250 mL. El medio definido es como se describió en Peter M. Bruinenberg, Johannes P. Van Dijken y W. Alexander Schefferes, 1983, An Enzymatic Analysis of NADPH Production and Consumption in *Candida utilis*, *J. General Microbiology* vol. 129, págs. 965-971, excepto por la presencia de glucosa adicional tal como se indica, y un incremento de ácido nicotínico hasta 5 mg/L.

Los cultivos resultantes se usan para inocular 50 mL del medio definido que contiene 100 g/L de glucosa en matraces con deflectores de 250 mL hasta una DO<sub>600</sub> de 0,2. Estos matraces se incuban después a 100 rpm durante 22 horas a 30 °C. En el medio se analiza después el contenido de glucosa, glicerol y etanol mediante HPLC. También se determina el rendimiento de biomasa.

50 La cepa CD1822 consume toda la glucosa durante el cultivo de 22 horas, y produce 6,0 g/kg de glicerol, 34,54 g/kg de etanol y biomasa hasta una DO<sub>600</sub> de 14,8.

La cepa CD2624, que tiene una alteración de un alelo de *GPD1*, consume toda la glucosa, produce 5,88 g/kg de glicerol y 35,25 g/kg de etanol. Se produce biomasa hasta una DO<sub>600</sub> de 14,5.

55 La cepa CD2627, que tiene una alteración de ambos alelos de *GPD1*, consume toda la glucosa excepto 12,39 g/kg durante 22 horas. La producción de glicerol es de 0,34 g/kg. La producción de etanol es de 23,06 g/kg, y se produce biomasa hasta una DO<sub>600</sub> de 11,5. Estos resultados indican que la alteración de los alelos de *GPD1* en *I. orientalis* da como resultado una pequeña reducción de las velocidades de consumo de glucosa, y una pequeña reducción de la producción de etanol y la producción de biomasa en estas condiciones. Sin embargo, la cepa CD2627 crece bien

y produce bien etanol, con una producción mínima de glicerol. Los resultados indican además que la capacidad de crecimiento y producción de los mutantes por delección de *GPD1* no depende de la alteración de la actividad de PDC o de la adición de una ruta desde piruvato hasta lactato.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> NatureWorks LLC Dundon, Catherine Asleson Suominen, Pirkko Aristidou, Aristos Rush, Brian J. Koivuranta, Kari Hause, Benjamin Matthew McMullin, Thomas W. Roberg-Perez, Kevin

5 <120> Células de levadura que tienen una ruta alterada desde dihidroxiacetona fosfato hasta glicerol

<130> 1206A WO

<140> 07753061.6

10 <141>13-03- 2007

<150> 60/781, 674

<151>13-03- 2006

15 <160> 92

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 415

<212> PRT

<213> Issatchenkia orientalis

<220>

25 <221> característica miscelánea

<222> (14)..(14)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

30 <221> característica miscelánea

<222> (161)..(161)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

35 <221> característica miscelánea

<222> (272)..(272)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

40 <221> característica miscelánea

<222> (287)..(287)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

45 <221> característica miscelánea

<222> (347)..(347)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 1

Met Phe Leu Ile Ser Lys Ser Leu His Phe Thr Arg Ser Xaa Ser Asn

50 1

5

10

15

# ES 2 620 770 T3

Thr Ile Lys Thr Leu Asn Arg Ser Asn Ile Lys Met Val Ser Pro Ala  
 20 25 30

Glu Arg Leu Ser Thr Ile Ala Ser Thr Ile Lys Pro Asn Arg Lys Asp  
 35 40 45

Ser Thr Ser Leu Gln Pro Glu Asp Tyr Pro Glu His Pro Phe Lys Val  
 50 55 60

Thr Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Cys Thr Ile Ala Lys Val Ile  
 65 70 75 80

Ala Glu Asn Thr Val Glu Arg Pro Arg Gln Phe Gln Arg Asp Val Asn  
 85 90 95

Met Trp Val Tyr Glu Glu Leu Ile Glu Gly Glu Lys Leu Thr Glu Ile  
 100 105 110

Ile Asn Thr Lys His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Lys Leu  
 115 120 125

Pro Val Asn Val Val Ala Val Pro Asp Ile Val Glu Ala Cys Ala Gly  
 130 135 140

Ser Asp Leu Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Ile  
 145 150 155 160

Xaa Ser Gln Leu Lys Gly Lys Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile Ser  
 165 170 175

Cys Leu Lys Gly Leu Asp Val Asn Pro Asn Gly Cys Lys Leu Leu Ser  
 180 185 190

Thr Val Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Ala Leu Ser Gly  
 195 200 205

Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Gln Cys Lys Trp Ser Glu Thr Thr  
 210 215 220

Val Ala Tyr Thr Ile Pro Asp Asp Phe Arg Gly Lys Gly Lys Asp Ile  
 225 230 235 240

Asp His Gln Ile Leu Lys Ser Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val  
 245 250 255

Arg Val Ile Ser Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala Gly Ala Leu Xaa  
 260 265 270

ES 2 620 770 T3

Asn Val Val Ala Met Ala Ala Gly Phe Val Glu Gly Leu Gly Xaa Gly  
 275 280 285

Asp Asn Ala Lys Ala Ala Val Met Arg Ile Gly Leu Val Glu Thr Ile  
 290 295 300

Gln Phe Ala Lys Thr Phe Phe Asp Gly Cys His Ala Ala Thr Phe Thr  
 305 310 315 320

His Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Ala Gly Gly  
 325 330 335

Arg Asn Val Arg Val Gly Arg Tyr Met Ala Xaa His Ser Val Ser Ala  
 340 345 350

Thr Glu Ala Glu Glu Lys Leu Leu Asn Gly Gln Ser Cys Gln Gly Ile  
 355 360 365

His Thr Thr Arg Glu Val Tyr Glu Phe Leu Ser Asn Met Gly Arg Thr  
 370 375 380

Asp Glu Phe Pro Leu Phe Thr Thr Thr Tyr Arg Ile Ile Tyr Glu Asn  
 385 390 395 400

Phe Pro Ile Glu Lys Leu Pro Glu Cys Leu Glu Pro Val Glu Asp  
 405 410 415

<210> 2

<211> 434

5 <212> PRT

<213> Kluyveromyces marxianus

<400> 2

Met Ile Gln Phe Gly Arg Ser Phe Cys Tyr Asn Ser Ile Val Lys Ser  
 1 5 10 15

Phe Gln Ile Arg Lys Ser Ile Thr Arg Phe Arg Leu Thr Asp Ile Tyr  
 20 25 30

Thr Asn Arg Val Thr Ile Asn Thr Arg Arg Asn Ile Ser Asn Met Ser  
 35 40 45

Pro Ala Ser Asp Arg Leu Lys Gln Thr Ser Ser Ile Leu Ser Lys Ser  
 50 55 60

Val Glu Pro Lys Ala Asp Ser Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser  
 65 70 75 80

Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Ala

10

ES 2 620 770 T3

				85					90					95			
Leu	Arg	Pro	Asn	Leu	Phe	Val	Lys	Arg	Val	Asp	Met	Trp	Val	Phe	Glu		
			100					105					110				
Glu	Gln	Ile	Asp	Gly	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Ile	Asn	Thr	Arg	His		
		115					120					125					
Glu	Asn	Val	Lys	Tyr	Leu	Pro	Gly	Ile	Lys	Leu	Pro	Asn	Asn	Leu	Val		
	130					135					140						
Ala	Asn	Pro	Asp	Ile	Val	Asp	Ala	Ala	Lys	Asp	Ala	Asp	Ile	Leu	Val		
145					150					155					160		
Phe	Asn	Ile	Pro	His	Gln	Phe	Leu	Pro	Lys	Val	Cys	Ser	Gln	Ile	Lys		
				165					170						175		
Gly	Lys	Ile	Lys	Pro	Gln	Ala	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe		
			180					185					190				
Asp	Val	Gly	Lys	Asp	Gly	Val	Lys	Leu	Leu	Ser	Thr	Tyr	Ile	Lys	Asp		
		195					200					205					
Thr	Leu	Asn	Ile	Glu	Cys	Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Leu	Ala	Pro		
	210					215						220					
Glu	Val	Ala	Lys	Glu	Asn	Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	Gln	Ile		
225					230					235					240		
Pro	Glu	Asp	Tyr	Lys	Gly	Ala	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Ser	Leu	Leu		
				245					250					255			
Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg	Pro	Tyr	Phe	His	Val	Asn	Val	Ile	His	Asp		
			260					265						270			
Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Val	Ala	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Ile	Ala	Leu		
		275					280					285					
Gly	Cys	Gly	Tyr	Val	Glu	Gly	Leu	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Ser	Ala		
	290					295					300						
Ala	Ile	Gln	Arg	Val	Gly	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Thr	Phe	Gly	Arg	Met		
305					310					315					320		
Phe	Phe	Pro	Glu	Cys	Arg	Val	Glu	Thr	Phe	Tyr	Lys	Glu	Ser	Ala	Gly		
				325					330						335		
Val	Ala	Asp	Leu	Ile	Thr	Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Arg	Val		

ES 2 620 770 T3

340

345

350

Ala Lys His Met Ala Ile Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys  
355 360 365

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

Val His Glu Trp Leu Glu Thr Cys Gly Lys Ile Asn Glu Phe Pro Leu  
385 390 395 400

Phe Glu Ala Ile Tyr Gln Ile Thr Tyr Gly Asn Ala Ser Met Glu Gln  
405 410 415

Ile Pro Glu Met Ile Glu Glu Leu Glu Cys Ile Asp Tyr Asn Val Lys  
420 425 430

Lys His

<210> 3

<211> 391

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn  
1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu  
20 25 30

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

10

# ES 2 620 770 T3

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

ES 2 620 770 T3

<210> 4  
 <211> 440  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 4  
 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  
 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

ES 2 620 770 T3

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

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> 5  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> Candida glabrata

5

ES 2 620 770 T3

400> 5

Met Ser Asn Ser Ala Ala Gly Arg Leu Asn Gln Thr Ser His Ile Leu  
 1 5 10 15

Asn Glu Ser Ile Lys Asn Asp Asp Ile Ser Leu Arg Arg Ser Gln Pro  
 20 25 30

Ser Thr Thr Ser Leu Gln Ala Leu Glu His Pro Phe Lys Val Thr Val  
 35 40 45

Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile Ala Lys Val Val Ala Glu  
 50 55 60

Asn Thr Ala Leu Asn Pro His Leu Phe Val Ser Arg Val Asp Met Trp  
 65 70 75 80

Val Phe Glu Glu Lys Ile Asp Gly Lys Asn Leu Thr Glu Ile Ile Asn  
 85 90 95

Glu Gln His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Asp Ile Lys Leu Pro Glu  
 100 105 110

Asn Leu Val Ala Asn Pro Asn Leu Ile Asp Ser Val Lys Gly Ala Asp  
 115 120 125

Ile Leu Ile Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Ile Val Ser  
 130 135 140

Asn Leu Lys Asn His Val Gly Pro His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu  
 145 150 155 160

Lys Gly Phe Glu Val Gly Lys Lys Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr  
 165 170 175

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

Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala  
 195 200 205

Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly Glu Gly Lys Asp Val Asp His  
 210 215 220

Lys Leu Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val  
 225 230 235 240

ES 2 620 770 T3

Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val  
 245 250 255

Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn  
 260 265 270

Ala Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe  
 275 280 285

Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg Val Gln Thr Tyr Tyr Gln Glu  
 290 295 300

Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn  
 305 310 315 320

Val Arg Val Ala Lys His Met Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Asp  
 325 330 335

Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr  
 340 345 350

Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu Thr Cys Glu Met Thr His Glu  
 355 360 365

Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile Val Tyr Asn Asn Val Pro  
 370 375 380

Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu Glu Leu Glu Cys Ile Ala Asp  
 385 390 395 400

- 5 <210> 6
- <211> 389
- <212> PRT
- <213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 6  
 Met Ser Gln Tyr Arg Ala Asn Gln Arg Leu Gln Gln Leu Ser Asn Ile  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Asn Gln Leu Ser Ala Glu Lys Ser Leu Lys Pro Glu Thr  
 20 25 30

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

Ala Lys Val Leu Ala Glu Asn Thr Ala Glu Lys Pro Asp Thr Phe Ala  
 50 55 60

10 Lys Gln Val Asp Met Trp Val Phe Gln Glu Lys Ile Asp Gly Thr Asn

# ES 2 620 770 T3

65		70		75		80
Leu Thr Glu Ile Ile Asn Asn Lys His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro		85		90		95
Gly Val Lys Leu Pro Glu Asn Leu His Ala Glu Pro Asp Ile Val Lys		100		105		110
Ala Ala Gln Gly Ala Asp Leu Leu Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe		115		120		125
Leu Pro Lys Ile Cys Lys Gln Leu Lys Gly Thr Leu Lys Pro Thr Thr		130		135		140
Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Leu Glu Val Thr Pro Asp Gly Cys		145		150		155
Lys Leu Leu Ser Thr Tyr Ile Thr Glu Asn Leu Gly Ile Glu Cys Gly		165		170		175
Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Arg Cys Lys Trp		180		185		190
Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Asn Ile Pro Ala Asp Phe Lys Gly Pro		195		200		205
Gly Lys Asp Ile Asp Ser Ala Val Leu Lys Glu Ala Phe His Arg Pro		210		215		220
Tyr Phe His Val Asn Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Val Ser Val Ala		225		230		235
Gly Ala Leu Lys Asn Ile Val Ala Ile Ala Val Gly Phe Val Glu Gly		245		250		255
Leu Gly Trp Gly Asp Asn Ala Lys Ser Ala Ile Met Arg Val Gly Leu		260		265		270
Ile Glu Thr Ile Asn Phe Ser Asn Met Phe Phe Pro Asn Ser Lys Pro		275		280		285
Thr Thr Phe Thr His Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr		290		295		300
Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Gly Arg His Met Ser Lys Thr		305		310		315
Gly Glu Ser Ala Glu Glu Ala Glu Lys Lys Leu Leu Asn Gly Gln Ser						

ES 2 620 770 T3

325

330

335

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

Val Gly Lys Thr Asp Gln Phe Pro Leu Phe Glu Ala Thr Tyr Gln Ile  
355 360 365

Ile Tyr Gly Asp Glu Ser Ile Gln Asn Leu Pro Asn Leu Leu Glu Asp  
370 375 380

His Ser Leu Phe Lys  
385

<210> 7

<211> 393

<212> PRT

<213> Pichia jadinii

5

<400> 7

Met Leu Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Ser Thr Met Ser Ser Ala Gln  
1 5 10 15

Gln Arg Leu Ala Gln Val Gly Ser His Leu Thr Ala Gln Lys Gln Ser  
20 25 30

Leu Ala Pro Gln Arg Pro Tyr Lys Ile Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn  
35 40 45

Trp Gly Thr Thr Ile Ala Lys Val Leu Ala Glu Asn Ala Gly Leu Arg  
50 55 60

Pro His Leu Phe Gln His Gln Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Lys  
65 70 75 80

Ile Asn Gly Val Asn Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Gln His Glu Asn  
85 90 95

Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Lys Leu Pro Lys Asn Leu His Ala Glu  
100 105 110

Pro Ser Ile Val Lys Ala Ala Glu Gly Ala Asp Leu Leu Val Phe Asn  
115 120 125

Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Gly Ile Cys Lys Gln Leu Ser Lys Ala  
130 135 140

Thr Leu Lys Pro His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Leu Glu  
145 150 155 160

ES 2 620 770 T3

Val Thr Pro Asn Gly Cys Lys Leu Leu Ser Thr Tyr Ile Thr Glu His  
 165 170 175

Leu Gly Val His Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu  
 180 185 190

Val Ala Lys Glu Lys Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Arg Leu Pro  
 195 200 205

Asn Asp Phe Gln Gly His Gly Lys Asp Ile Asp Arg Tyr Val Leu Arg  
 210 215 220

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

Ala Gly Val Ser Leu Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly  
 245 250 255

Val Gly Phe Val His Gly Leu Asn Trp Gly Asp Asn Ala Ala Ser Ala  
 260 265 270

Ile Gln Arg Phe Gly Leu Asn Glu Thr Ile Lys Phe Ala Glu Val Phe  
 275 280 285

Phe Pro Gly Glu Thr Asn Gln Asp Thr Phe Thr Lys Glu Ser Ala Gly  
 290 295 300

Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val  
 305 310 315 320

Ala Lys Ala Met Ala Ile Thr Gly Lys Ser Ala Val Glu Val Glu Arg  
 325 330 335

Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Ser Lys Glu  
 340 345 350

Val His Glu Leu Leu Ala Ala Lys Asn Leu Thr Lys Glu Phe Pro Leu  
 355 360 365

Phe Glu Ala Ile Tyr Gln Ile Val Tyr Gly Thr Glu Ser Ile Glu Arg  
 370 375 380

Leu Pro Glu Leu Ile Glu Glu Asp Glu  
 385 390

<210> 8  
 <211> 248

ES 2 620 770 T3

<212> PRT

<213> *Kluyveromyces marxianus*

<400> 8

Met Ser Ala Ala Pro Ile Ser Leu Arg Val Asn Ala Ala Leu Phe Asp  
 1 5 10 15

Val Asp Gly Thr Leu Ile Ile Ser Gln Gly Ala Ile Ala Glu Phe Trp  
 20 25 30

Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ser Gln His Val Ile  
 35 40 45

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

Pro Asp Tyr Ala Asn Glu Glu Tyr Val Thr Lys Leu Glu Gly Glu Ile  
 65 70 75 80

Pro Asp Lys Phe Gly Lys His Ala Ile Glu Val Pro Gly Ala Ile Lys  
 85 90 95

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

Thr Ser Gly Thr Phe Glu Met Ala His Lys Trp Phe Asp Ile Leu Gly  
 115 120 125

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

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

Pro Ile Asn Glu Ala Asn Pro Ala Ala Ser Lys Val Ile Val Phe Glu  
 165 170 175

Asp Ala Pro Ala Gly Ile Leu Ala Gly Lys Ala Ala Gly Cys Lys Ile  
 180 185 190

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

Cys Asp Ile Val Ile Lys Asp His Thr Lys Leu Arg Val Ala Ala Tyr  
 210 215 220

His Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Phe Val Phe Asp Glu Tyr Leu Tyr  
 225 230 235 240

Ala Lys Asp Asp Leu Leu Glu Trp  
 245

ES 2 620 770 T3

<210> 9

<211> 250

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 9

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

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

ES 2 620 770 T3

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

5 <210> 10  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 10  
 Met Lys Arg Phe Asn Val Leu Lys Tyr Ile Arg Thr Thr Lys Ala Asn  
 1 5 10 15

Ile Gln Thr Ile Ala Met Pro Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys  
 20 25 30

Ile Asn Ala Ala Leu Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln  
 35 40 45

Pro Ala Ile Ala Ala Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr  
 50 55 60

Phe Asp Ala Glu His Val Ile His Ile Ser His Gly Trp Arg Thr Tyr  
 65 70 75 80

Asp Ala Ile Ala Lys Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asp Glu Glu Tyr Val  
 85 90 95

Asn Lys Leu Glu Gly Glu Ile Pro Glu Lys Tyr Gly Glu His Ser Ile  
 100 105 110

Glu Val Pro Gly Ala Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro  
 115 120 125

Lys Glu Lys Trp Ala Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Lys  
 130 135 140

Lys Trp Phe Asp Ile Leu Lys Ile Lys Arg Pro Glu Tyr Phe Ile Thr  
 145 150 155 160

Ala Asn Asp Val Lys Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys  
 165 170 175

10 Gly Arg Asn Gly Leu Gly Phe Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys

ES 2 620 770 T3

180

185

190

Ser Lys Val Val Val Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly  
195 200 205

Lys Ala Ala Gly Cys Lys Ile Val Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu  
210 215 220

Asp Phe Leu Lys Glu Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu  
225 230 235 240

Ser Ile Arg Val Gly Glu Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu  
245 250 255

Ile Phe Asp Asp Tyr Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp  
260 265 270

<210> 11

<211> 236

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 11

Met Ile Pro Glu Ala Cys Leu Phe Asp Met Asp Gly Leu Leu Val Asp  
1 5 10 15

Thr Glu Ser Ile Tyr Thr Lys Ser Thr Asn Ile Ile Leu Lys Arg Tyr  
20 25 30

Asn Lys Gly Pro Phe Ser Met Glu Val Lys Ala Lys Met Met Gly Arg  
35 40 45

Thr Ser Lys Glu Ala Ser Arg Ile Phe Leu Asp Trp Ser Gly Ile Asp  
50 55 60

Leu Thr Cys Glu Glu Tyr Ile Ala Leu Gln Arg Glu Thr Gln Ala Glu  
65 70 75 80

Leu Trp Arg His Thr Lys Pro Leu Pro Gly Val Met Asn Leu Leu Ser  
85 90 95

Lys Leu Lys Ser Leu Asn Ile Pro Ile Ala Leu Ala Thr Ser Ser Asp  
100 105 110

Thr His Asn Phe Glu Lys Lys Ser Ala His Leu Ser His Leu Phe Asp  
115 120 125

His Phe Asp Gly Asn Ile Ile Thr Gly Asp Asp Pro Arg Leu Pro Val  
130 135 140

5

ES 2 620 770 T3

Gly Arg Gly Lys Pro His Pro Asp Ile Trp Phe Ile Ala Leu Lys Met  
 145 150 155 160

Ile Asn Asp Lys Arg Lys Ala Gln Gly Gln Ala Glu Ile Leu Pro Glu  
 165 170 175

Asn Cys Leu Val Phe Glu Asp Ser Ile Thr Gly Val Gln Ser Gly Arg  
 180 185 190

Ala Ala Gly Met Lys Val Val Trp Val Pro Asp Val Asn Ile Leu Pro  
 195 200 205

Phe Phe Ser Leu Ser Pro Glu Gln Ala Ala Asp Lys His Ile Thr Lys  
 210 215 220

Val Leu Ser Leu Glu Asn Phe Asp Val Thr Lys Val  
 225 230 235

- 5 <210> 12
- <211> 246
- <212> PRT
- <213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 12  
 Met Ala Ala Lys His Val Lys Tyr Met Ala Cys Leu Phe Asp Met Asp  
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Val Asp Ser Glu Thr Ile Tyr Thr Lys Thr Thr Asn Leu  
 20 25 30

Ile Leu Asp Arg Tyr Gly Lys Asp Pro Leu Pro Ile Ser Val Lys Ala  
 35 40 45

Gln Met Met Gly Arg Pro Gly Ser Ala Ala Ala Lys Val Val Ile Asp  
 50 55 60

Trp Ser Asn Ile Pro Met Thr Pro Gln Gln Phe Val Asp Glu Gln Gln  
 65 70 75 80

Val Ile Arg Ala Lys Phe Trp Ser Ser Leu Lys Pro Met Pro Gly Ala  
 85 90 95

Glu Ser Leu Ile Asn Asn Leu Ser Asn His Gly Ile Asp Ile Gly Val  
 100 105 110

10 Cys Thr His Pro Tyr Ala Ile Ile Lys Thr Ala His Leu Lys His Ile  
 115 120 125

ES 2 620 770 T3

Phe Glu Lys Phe Gly Lys Asn Val Ile Thr Gly Asp Asn Pro Ser Ile  
 130 135 140

Ala Pro Gly Arg Gly Lys Pro Phe Pro Asp Ile Trp Leu Lys Val Leu  
 145 150 155 160

Asn Leu Ile Asn Glu Ser Arg Lys Gln Arg Gly Leu Lys Ala Leu Thr  
 165 170 175

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

Ala Lys Ala Ala Gly Met His Val Ile Trp Val Pro Asp Ala Ala Ile  
 195 200 205

Lys Asn Leu Val Gly Asp Gln Leu Asn Glu Ile Val Asp Ser Gln Cys  
 210 215 220

Glu Thr Leu Pro Ser Leu Ser Glu Phe Asp Ile Asn Lys Tyr Leu Asn  
 225 230 235 240

Ile Asn Ser Lys Gln Ala  
 245

<210> 13

5 <211> 450

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 13

Met Ile Gly Pro Arg Leu Cys Ala Ala Thr Pro Arg Phe Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Ser Leu Ala His Arg Asn Ser Lys Val Phe Ala Leu Ala Ser Ser Asn  
 20 25 30

Ala Val Ala Gln Arg Trp Gly Lys Arg Phe Tyr Ala Pro Ile Glu Thr  
 35 40 45

Glu Thr Pro His Lys Val Gly Val Glu Phe Glu Glu Ser Lys Asp Arg  
 50 55 60

Ile Phe Thr Ser Pro Gln Lys Tyr Val Gln Gly Arg His Ala Phe Thr  
 65 70 75 80

Arg Ser Tyr Met Tyr Val Lys Lys Trp Ala Thr Lys Ser Ala Val Val  
 85 90 95

10

# ES 2 620 770 T3

Leu Ala Asp Gln Asn Val Trp Asn Ile Cys Ala Asn Lys Ile Val Asp  
 100 105 110

Ser Leu Ser Gln Asn Gly Met Thr Val Thr Lys Leu Val Phe Gly Gly  
 115 120 125

Glu Ala Ser Leu Val Glu Leu Asp Lys Leu Arg Lys Gln Cys Pro Asp  
 130 135 140

Asp Thr Gln Val Ile Ile Gly Val Gly Gly Gly Lys Thr Met Asp Ser  
 145 150 155 160

Ala Lys Tyr Ile Ala His Ser Met Asn Leu Pro Ser Ile Ile Cys Pro  
 165 170 175

Thr Thr Ala Ser Ser Asp Ala Ala Thr Ser Ser Leu Ser Val Ile Tyr  
 180 185 190

Thr Pro Asp Gly Gln Phe Gln Lys Tyr Ser Phe Tyr Pro Leu Asn Pro  
 195 200 205

Asn Leu Ile Phe Ile Asp Thr Asp Val Ile Val Arg Ala Pro Val Arg  
 210 215 220

Phe Leu Ile Ser Gly Ile Gly Asp Ala Leu Ser Thr Trp Val Glu Thr  
 225 230 235 240

Glu Ser Val Ile Arg Ser Asn Ser Thr Ser Phe Ala Gly Gly Val Ala  
 245 250 255

Ser Ile Ala Gly Arg Tyr Ile Ala Arg Ala Cys Lys Asp Thr Leu Glu  
 260 265 270

Lys Tyr Ala Leu Ser Ala Ile Leu Ser Asn Thr Arg Gly Val Cys Thr  
 275 280 285

Glu Ala Phe Glu Asn Val Val Glu Ala Asn Thr Leu Met Ser Gly Leu  
 290 295 300

Gly Phe Glu Asn Gly Gly Leu Ala Ala Ala His Ala Ile His Asn Gly  
 305 310 315 320

Met Thr Ala Ile His Gly Pro Val His Arg Leu Met His Gly Glu Lys  
 325 330 335

Val Ala Tyr Gly Thr Leu Val Gln Val Val Leu Glu Asp Trp Pro Leu  
 340 345 350



<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 17  
 5 tttttgccg gcggatggag ggacaaatac 30  
  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 15 <400> 18  
 tggcggtagt cacaaggacg 20  
  
 <210> 19  
 <211> 20  
 20 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 25 <400> 19  
 agtgccgagg accgagaatc 20  
  
 <210> 20  
 <211> 32  
 30 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 35 <400> 20  
 aaaaaaacgc gtgtccctcc cacttacaac tc 32  
  
 40 <210> 21  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 21  
 50 ttttttgta ccccggaacc catctggaaa tc 32  
  
 <210> 22  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 22  
 aaaaaaacta gttaggtcgc tggatgtcct ac 32  
 60 <210> 23  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 65 <220>  
 <223> Cebador

<400> 23  
 tttttgccg gcaagtcggg catagaaggc 30

5 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 24  
 ggkgctaach tbgcymcmga r 21

15 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 25  
 dgtratbara tcrvcvacac c 21

25 <210> 26  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Cebador

<400> 26  
 krtygghycy ggtaactggg g 21

35 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Cebador

<400> 27  
 rtgraagtad ggctkgtgga a 21

45 <210> 28  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Cebador

<400> 28  
 ccattgccgg tgactcaag aatgtcg 27

55 <210> 29  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <223> Cebador

65 <220>  
 <223> Cebador

<400> 29  
 cgacattctt gagtcaccg gcaatgg 27

5 <210> 30  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 30  
 ggctgctgga tttgtcgaag gtttagg 27

15 <210> 31  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 31  
 25 ccttccttt acctctgaaa tcgtccg 27

<210> 32  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

35 <400> 32  
 tccccggtcg accggaactt agcttactcg tc 32

<210> 33  
 <211> 32  
 40 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

45 <400> 33  
 ttgcgaggat cctgagtgca gtagctgtac ac 32

<210> 34  
 50 <211> 706  
 <212> DNA  
 <213> Kluyveromyces thermotolerans

55

# ES 2 620 770 T3

```

<400> 34
cactcgcaag ctgtgccatc goccaacggt taattataag aatcaacat cagccaacaa      60
ctattttcgt cccctcttt tcagtggtaa cgagcaatta cattagtaag agactatfff      120
cttcagtgat ttgtaatfff ttttcagtga tttgtaattc tttctcgaaa tatgcgggct      180
waamtaatcc ggacattcac tacatgcaag gaaaaacgag aaccgcgag atttcctcag      240
taagtaacaa tgatgatcct tttacgcttc atcatcactt tocaaagttc taagctataa      300
gttcaagcct agatacgtg aaaaactcct gaccaacaat gtaaagaaaa caattacaat      360
tgtaagggtg aaaacatcta aaaatgaaat attttattgt acatgcacac cctgatagtc      420
attctcttac ttcacccctg aaagacgtgg ctgtacaaga gttggaatcg caaggctatg      480
agggttaaagt tagtgatcct tatgctcaaa agtggaaggc ctcaatagac cgtgacgacw      540
wmaaaaaama aamrmaagaa gagaggttaa aatatcccca agcttcttat gaagcgtatg      600
ccagaggagc attaacaaaa gacgtaaadc agaacagga aaaacttatt tgggcggact      660
ttgtcatttt gtcgtttcct atatggtggt cttctatgcc ggctag                      706

```

```

5 <210> 35
  <211> 30
  <212> DNA
  <213> Secuencia Artificial

```

```

10 <220>
    <223> Cebador

```

```

  <400> 35
  tgtcagcatg cactcgcaag ctgtgccatc 30

```

```

15 <210> 36
  <211> 33
  <212> DNA
  <213> Secuencia Artificial

```

```

20 <220>
    <223> Cebador

```

```

  <400> 36
  aacctgtcg actagccggc atagaagacc acc 33

```

```

25 <210> 37
  <211> 30
  <212> DNA
  <213> Secuencia Artificial

```

```

30 <220>
    <223> Cebador

```

```

35 <400> 37
  tgcaggatc cactcgcaag ctgtgccatc 30

```

```

40 <210> 38
  <211> 33
  <212> DNA
  <213> Secuencia Artificial

```

```

  <220>
  <223> Cebador

```

# ES 2 620 770 T3

<400> 38  
aaccttcccg ggtagccggc atagaagacc acc 33

5 <210> 39  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 39  
aaccaaagaa ttgttgctgc ttt 23

15 <210> 40  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 40  
25 ttcgaaaaca cctggtggac cgttc 25

<210> 41  
<211> 25  
<212> DNA  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

35 <400> 41  
gcggtgacct gggagatctg aattc 25

<210> 42  
<211> 12  
40 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

45 <400> 42  
gaattcagat ct 12

<210> 43  
<211> 25  
50 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
55 <223> Cebador

<400> 43  
gcggtgacct gggagatctg aattc 25

60 <210> 44  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

65 <220>  
<223> Cebador

<400> 44  
 ccaattctgc agcaactggc ttaacg 27

5 <210> 45  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 45  
 gcggtgacct gggagatctg aattc 25

15 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 46  
 gcctacccat ttggtctgcc c 21

25 <210> 47  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Cebador

35 <400> 47  
 gactccccgg agtgcgaaa tatga 25

40 <210> 48  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Cebador

<400> 48  
 gtgatagcgg gtccttcgc tacc 24

50 <210> 49  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Cebador

<400> 49  
 gcggtgacct gggagatctg aattc 25

60 <210> 50  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>  
 <223> Cebador

<400> 50  
gaattcagat ct 12

5 <210> 51  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 51  
gcgatctcga gattgctgc aacggcaaca tcaatg 36

15 <210> 52  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 52  
ctagcatctg attgtgttg tcgtgttt tgttt 36

25 <210> 53  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Cebador

35 <400> 53  
gcgatctcga gattgctgc aacggcaaca tcaatg 36

40 <210> 54  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Cebador

<400> 54  
actggccat ggtgtgtt gttgctgtg ttttg 36

50 <210> 55  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Cebador

<400> 55  
ccggaattcg atatctgggc wggkaatgcc aaygarttra atgc 44

60 <210> 56  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

65 <220>  
<223> Cebador

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (21)..(21)  
 5 <223> n es a, c, g, o t

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (33)..(33)  
 10 <223> n es a, c, g, o t

<400> 56  
 cgccgattca ggctcagta ngaraawgaa ccngtrtra artc 44

15 <210> 57  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 57  
 actgtcgagc tcagtatag gaattgacgg ctcatc 36

25 <210> 58  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Cebador

<400> 58  
 35 actgacgcgt cgacgtatca ttgtagccc acgccacc 38

<210> 59  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

45 <400> 59  
 cctccccgg gctgatagaa gggatgatg taatt 35

<210> 60  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

55 <400> 60  
 ccaagagtta tggggccca gttg 24

<210> 61  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 65 <223> Cebador

# ES 2 620 770 T3

<400> 61  
gcgatctcga gatttctgc aacggcaaca tcaatg 36

5 <210> 62  
<211> 69  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 62  
tggactagta catgcatgcg gtgagaaagt agaaagcaaa cattgttgtt gttgttgcg 60  
ttgtttttg 69

15 <210> 63  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 63  
cctccccgg ggatatcaa gttatattat taatgattca ag 42

25 <210> 64  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Cebador

<400> 64  
35 ggacgagagc tcgggccat gacttcagag ttgatttga gtc 43

<210> 65  
<211> 44  
<212> DNA  
40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

45 <400> 65  
ggacatgcat gcgagctcaa tgcgtgacac cgccatgatg gttg 44

<210> 66  
<211> 52  
50 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

55 <400> 66  
ggacatgcat gctacgtacc ctgcagggca ccaacagcaa cacccacctg aa 52

<210> 67  
<211> 43  
<212> DNA  
60 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 67  
 5 ggacatgcat gcgagctcat agtgaacaa aactggcat ttg 43  
  
 <210> 68  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 15 <400> 68  
 ggacatgcat gctacgtacc ctgcagggtg gtgcaactag gtttatgtgg ag 52  
  
 <210> 69  
 <211> 53  
 20 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25  
 <400> 69  
 cctccccgg ggatatctag ttagatagct cctcctccaa tcgaattatt agc 53  
  
 <210> 70  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 30 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 35  
 <400> 70  
 ggacgagagc tcgggcccta cgtctatgta tcataaatt gg 42  
  
 40 <210> 71  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 71  
 50 aaaaaacata tggagatgtt aatatgtggg tct 33  
  
 <210> 72  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 72  
 60 tttttcctg caggtcagta ataacagtgg aga 33  
  
 <210> 73  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 73  
 5 aaaaaaccgc ggggcctta tcaggtgcta 30  
  
 <210> 74  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 15 <400> 74  
 tttttgaat tcaaggtgc agcatgacag 30  
  
 <210> 75  
 <211> 20  
 20 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25  
 <400> 75  
 gagttcacc gtccagatag 20  
  
 <210> 76  
 <211> 22  
 30 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 35  
 <400> 76  
 ggacaacgta catggacgat tc 22  
  
 40 <210> 77  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 77  
 50 ctatctggac ggggaactc 20  
  
 <210> 78  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 78  
 60 ggactggggg tgtacaat 18  
  
 <210> 79  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 79  
 5 cttgtgcagg ctcagacttg 20  
  
 <210> 80  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 80  
 15 caaggcattc tggcagcttc 20  
  
 <210> 81  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 20 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 81  
 25 cggcttcaa agcggactta cc 22  
  
 <210> 82  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 30 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 82  
 aaggccgaca gccattcaa gg 22  
  
 <210> 83  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 83  
 50 gatacgtcga ccgcatctc gagcg 25  
  
 <210> 84  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 84  
 60 gttactagtg gtacagagaa cttgtaaaca attc 34  
  
 <210> 85  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 85  
 5 ggttatagcg gaaaacaccg ttgagag 27  
  
 <210> 86  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 15 <400> 86  
 ccgctagacc aacagtcac tag 23  
  
 <210> 87  
 <211> 23  
 20 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25  
 <400> 87  
 ctctatagg ttgagaccct cgg 23  
  
 <210> 88  
 <211> 26  
 30 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 35  
 <400> 88  
 gtgcatata tctaccaact ctaacg 26  
  
 40 <210> 89  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 89  
 50 catatggaga tgtaatatg tgggtc 26  
  
 <210> 90  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 90  
 60 caaggttgca gcatgacagc catcg 25  
  
 <210> 91  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 65 <213> Secuencia Artificial

# ES 2 620 770 T3

<220>

<223> Cebador

<400> 91

5 ggaccgatgg ctgtgtagaa 20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 92

15 acggcctcca gaagaagatg 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso de fermentación en el que una célula de levadura pre-duplicación del genoma completo que tiene una ruta metabólica nativa desde dihidroxiacetona fosfato hasta glicerol-3-fosfato hasta glicerol, que está modificada genéticamente para deleccionar o alterar al menos un gen nativo de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, se cultiva en condiciones de fermentación y en presencia de una fuente de carbono para producir un producto de fermentación deseado, en el que el rendimiento de glicerol es menor del 2% respecto del peso de la fuente de carbono que consume la célula, y por lo que se añade glicerol al medio de fermentación;
  - 5 en el que la fuente de carbono es un carbohidrato de hexosa, un oligómero de glucosa, un carbohidrato de pentosa, o un oligómero de xilosa;
  - 10 en el que la levadura pre-duplicación del genoma completo se selecciona de la especie *Issatchenkia orientalis*, *Pichia galeiformis*, *Pichia sp. YB-4149* (denominación del NRRL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifaciens* y *P. fermentans*.
2. El proceso de fermentación según la reivindicación 1, en el que la fuente de carbono es glucosa.
3. El proceso de fermentación según la reivindicación 1, en el que la célula se modifica genéticamente para producir un ácido orgánico.
  - 15 4. El proceso de fermentación según la reivindicación 1, en el que la célula contiene una delección o alteración de el/los gen(es) de piruvato descarboxilasa.
  5. El proceso de fermentación según la reivindicación 1, en el que las células son *Issatchenkia orientalis*.
  6. El proceso de fermentación según la reivindicación 1, en el que el producto de fermentación deseado es un ácido orgánico o su sal.
    - 20 7. El proceso de fermentación según la reivindicación 1, en el que el producto de fermentación deseado se produce con un rendimiento de al menos un 40% respecto del peso de la fuente de carbono que consume la célula.
    8. El proceso de fermentación según la reivindicación 7, en el que el rendimiento de glicerol es menor del 0,5% respecto del peso de la fuente de carbono que consume la célula.
  - 25 9. El proceso de fermentación según la reivindicación 8, en el que el producto de fermentación deseado es etanol.

FIG. 1

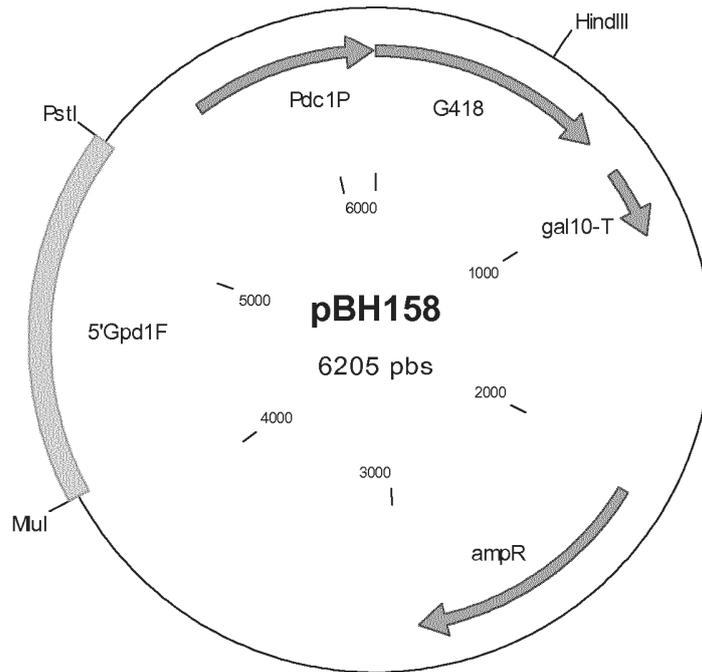


FIG. 2

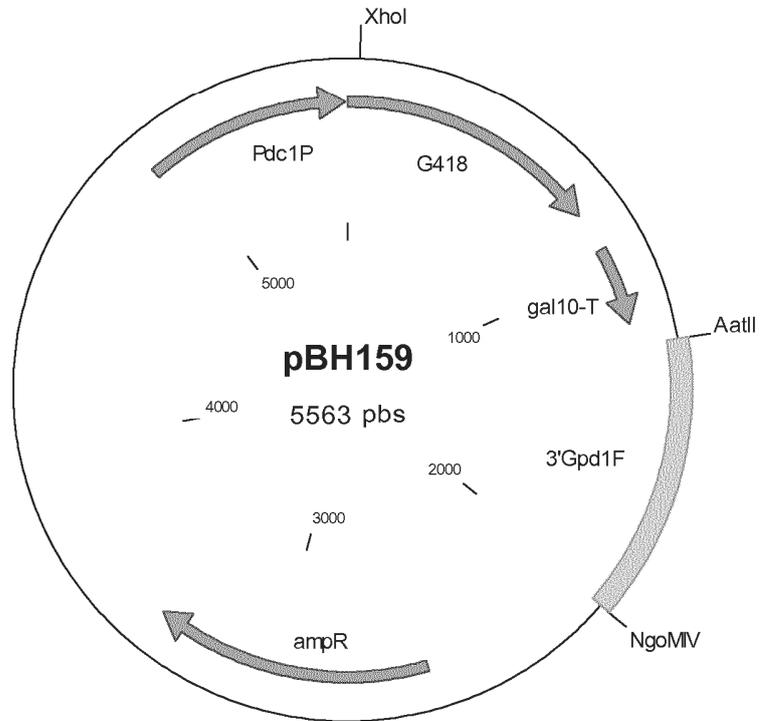


FIG. 3

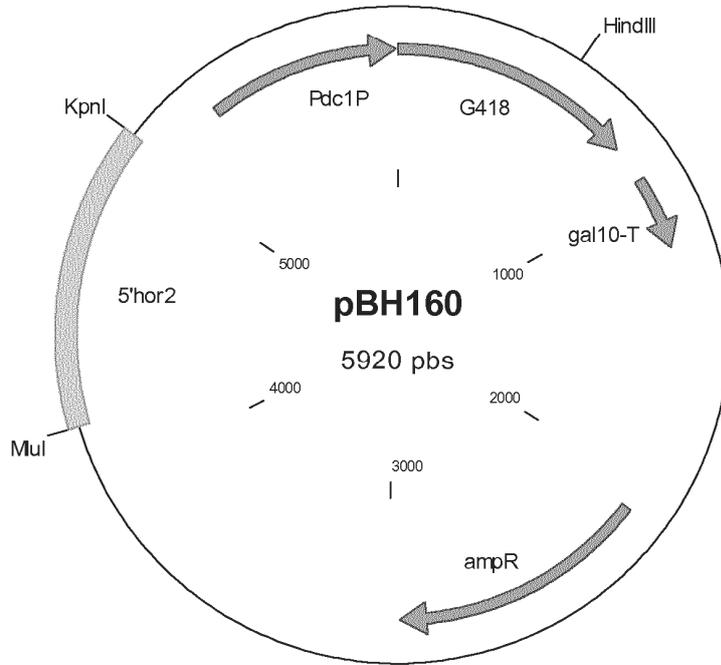


FIG. 4

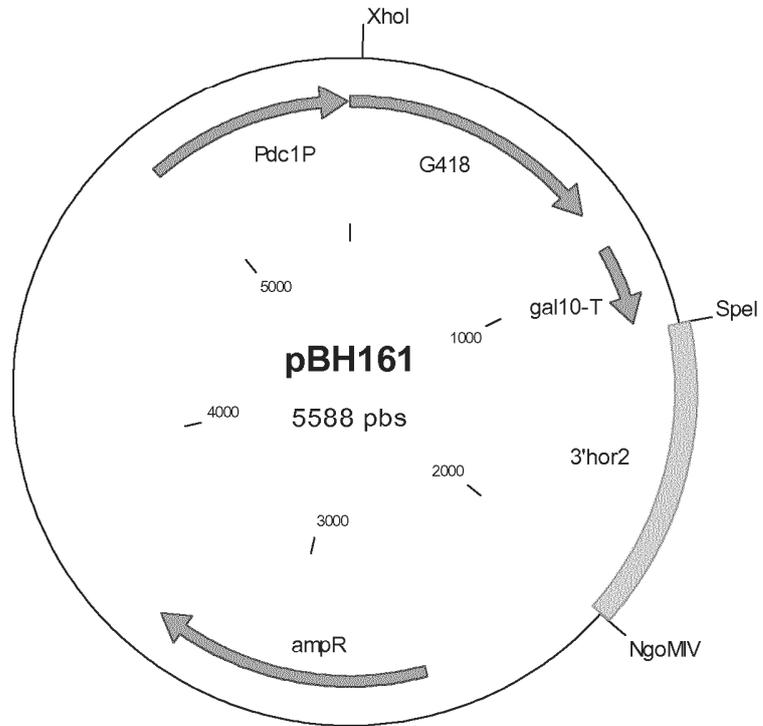


FIG. 5

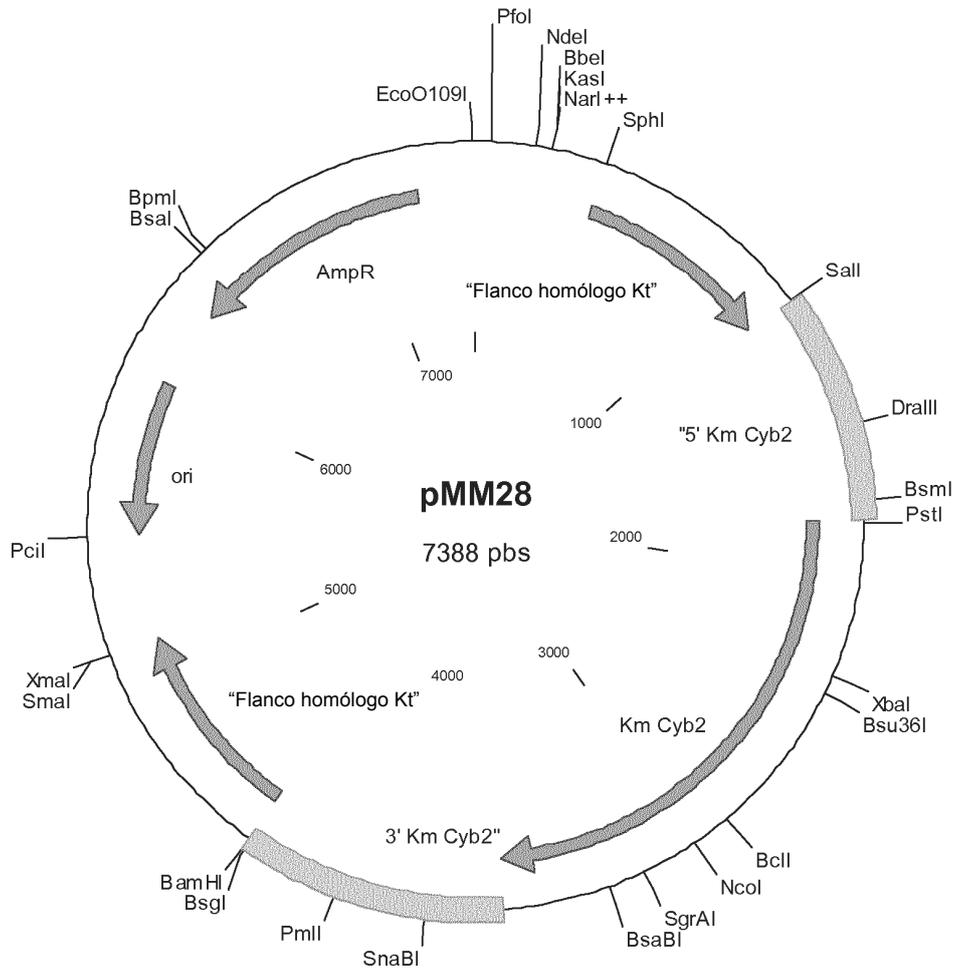


FIG. 6

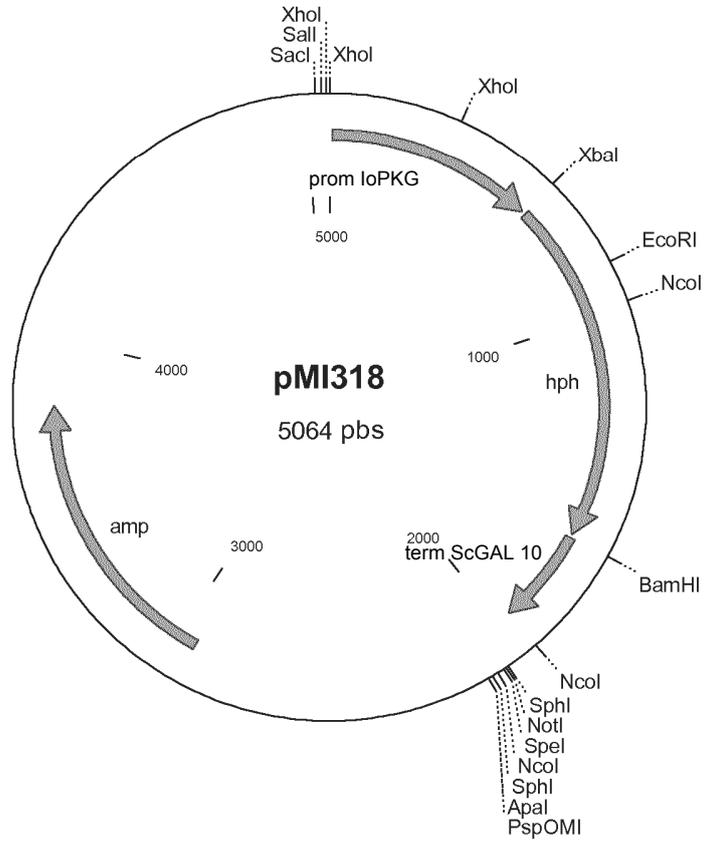


FIG. 7

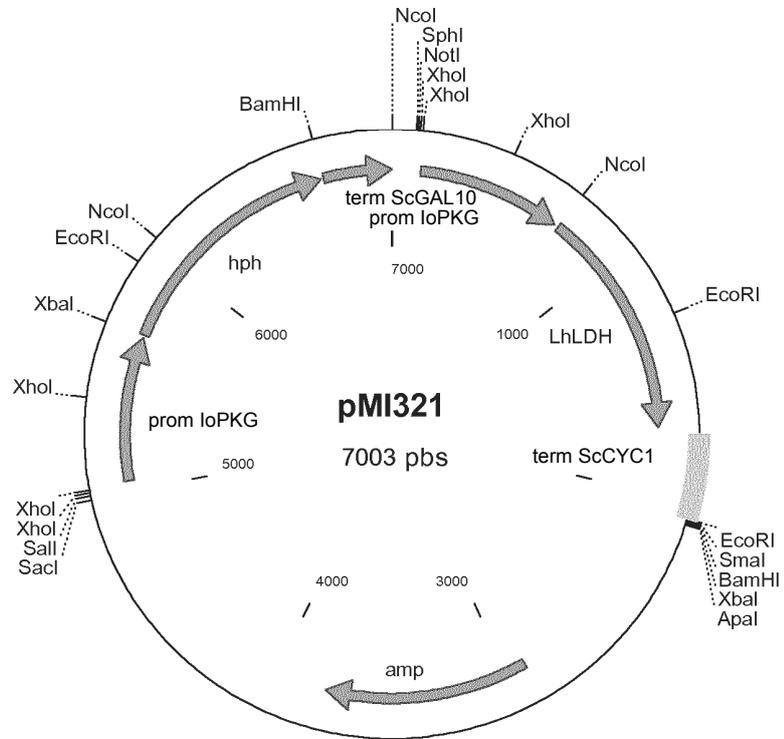


FIG. 8

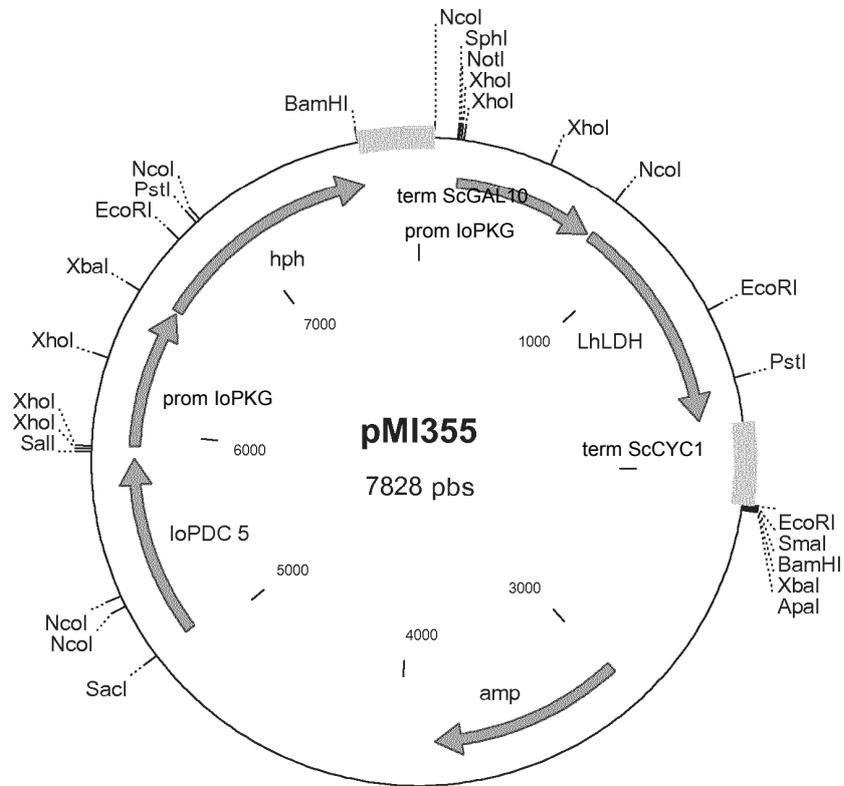


FIG. 9

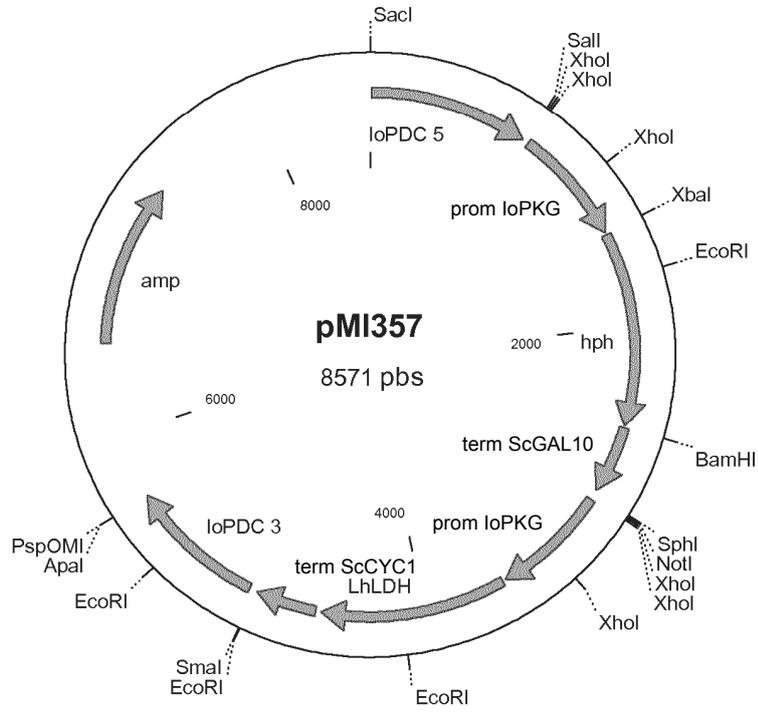


FIG. 10

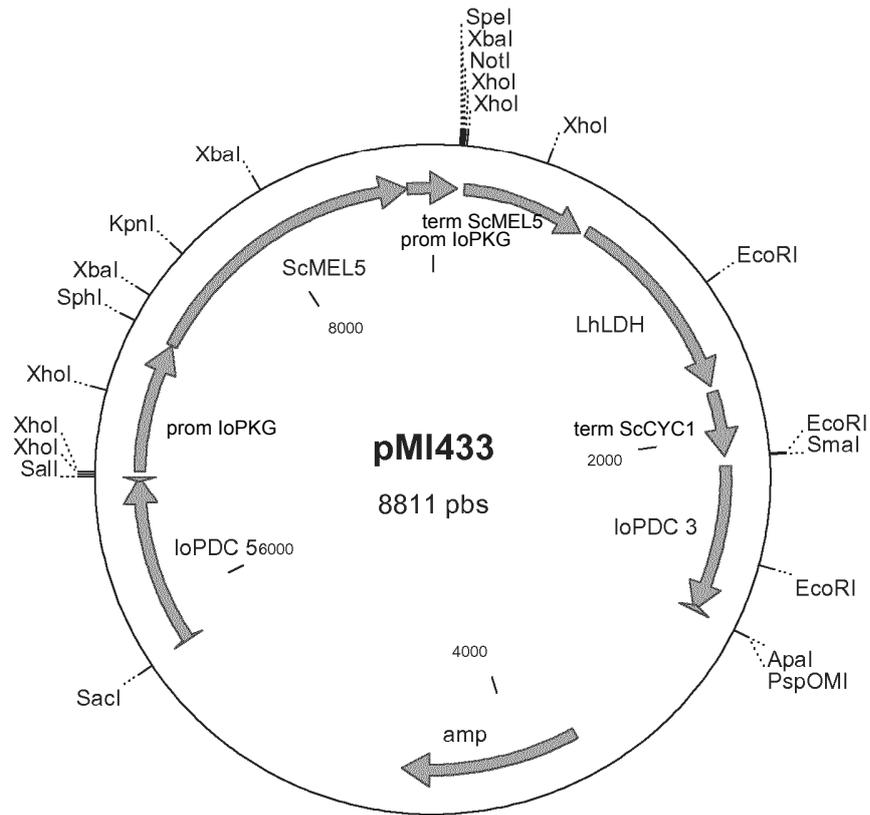


FIG. 11

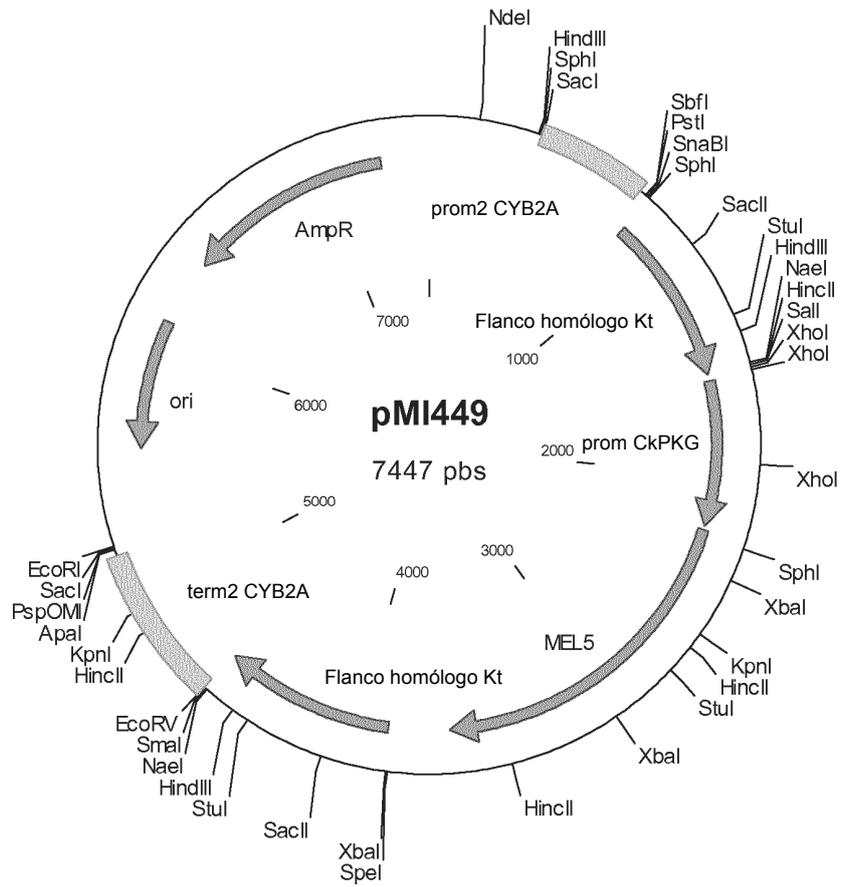


FIG. 12

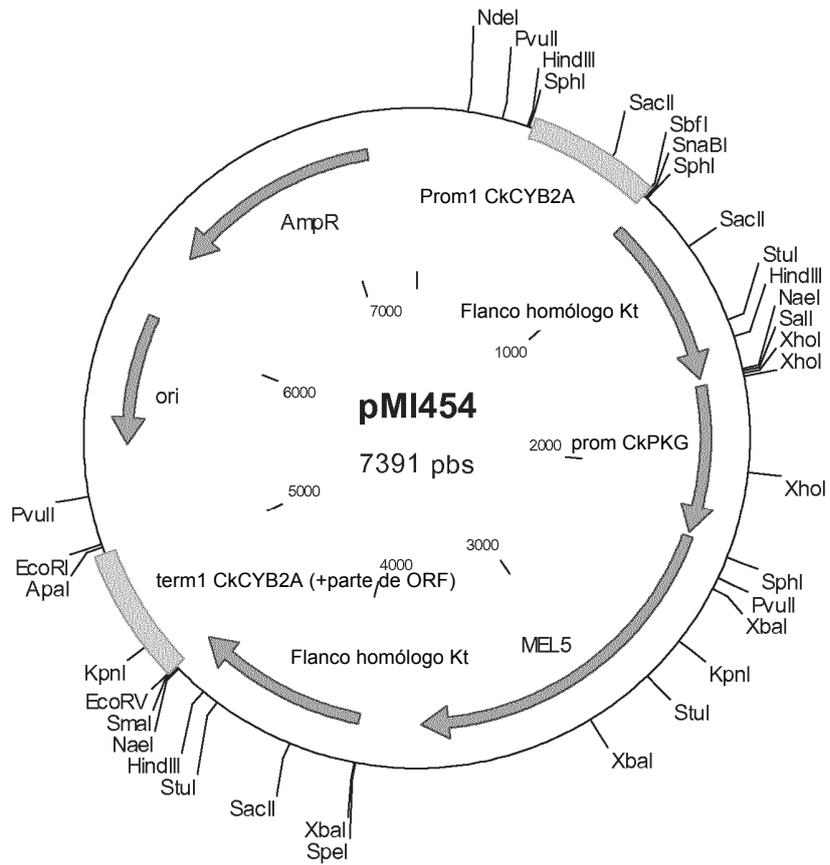


FIG. 13

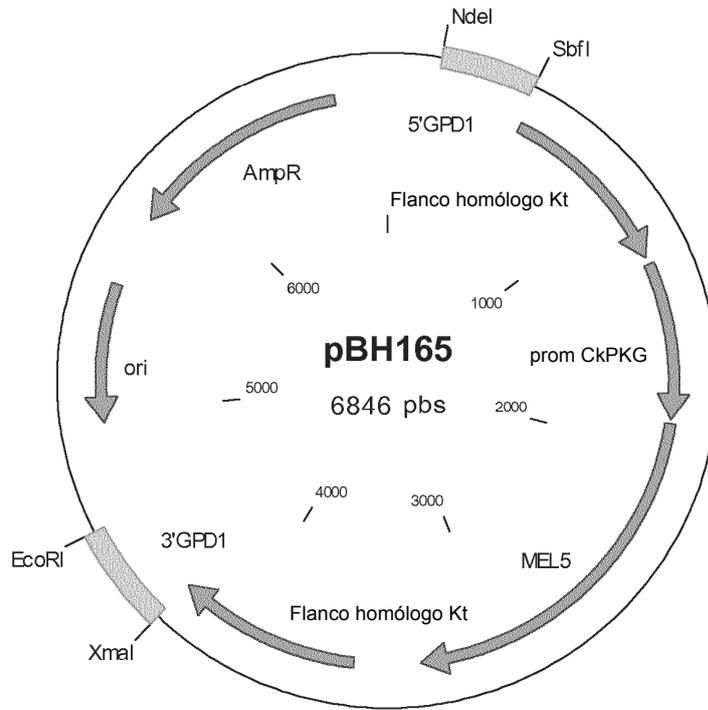


FIG. 14

