

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 653**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2010 PCT/NL2010/050475**
87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11010923**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010 E 10740412 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2456851**

54 Título: **Producción fermentativa de etanol libre de glicerol**

30 Prioridad:

24.07.2009 EP 09166360

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.03.2019

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**PRONK, JACOBUS THOMAS;
VAN MARIS, ANTONIUS JEROEN ADRIAAN y
GUADALUPE MEDINA, VICTOR GABRIEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 706 653 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

Producción fermentativa de etanol libre de glicerol

5 La presente invención se refiere a una célula de levadura recombinante que tiene la capacidad de producir un producto de fermentación deseado, a la construcción de dicha célula de levadura mediante modificación genética y a un proceso para producir un producto de fermentación, en el que se usa dicha célula de levadura.

10 La producción de etanol mediante *Saccharomyces cerevisiae* es actualmente, en volumen, el proceso de fermentación más grande sencillo en la biotecnología industrial. Un esfuerzo de investigación global está en progreso para expandir el rango de sustratos de *S. cerevisiae* para incluir hidrolizados lignocelulósicos, en particular biomasa lignocelulósica hidrolizada de materias primas no alimentarias (por ejemplo, cultivos energéticos y residuos agrícolas, residuos forestales o materiales de desecho industriales/de consumo que son ricos en celulosa, hemicelulosa y/o pectina) y para aumentar la productividad, la robustez y el rendimiento de producto.

15 La biomasa lignocelulósica es abundante, sin embargo, en general no se fermenta fácilmente mediante microorganismos que producen etanol de tipo silvestre, tal como *S. cerevisiae*. La biomasa tiene que hidrolizarse. El hidrolizado resultante es a menudo una mezcla de diversos monosacáridos y oligosacáridos, que pueden no ser todos sustratos adecuados para el microorganismo de tipo silvestre. Además, los hidrolizados normalmente comprenden ácido acético, formado como subproducto en particular cuando se hidroliza pectina o hemicelulosa, y -
20 dependiendo del tipo de hidrólisis - uno o más de otros subproductos o reactivos residuales que pueden afectar adversamente a la fermentación. En particular, se ha notificado que el ácido acético afecta negativamente a la cinética y/o estequiometría de la fermentación de azúcar mediante cepas de *S. cerevisiae* de tipo silvestre y modificadas genéticamente y su toxicidad está fuertemente aumentada a un pH de cultivo bajo (Helle *et al.* Enzyme Microb Technol 33 (2003) 786-792; Bellissimi *et al.* FEMS Yeast Res 9 (2009) 358-364).

30 Se han propuesto diversos enfoques para mejorar las propiedades fermentativas de organismos productores de etanol mediante modificación genética, y para mejorar el proceso de hidrólisis de la biomasa. Por ejemplo, una visión general de los desarrollos en la producción fermentativa de etanol a partir de hidrolizados de biomasa se proporciona en una revisión de A. van Maris *et al.* (Antonie van Leeuwenhoek (2006) 90:391-418). Se hace referencia a diversas maneras en las que puede modificarse *S. cerevisiae* y a diversos métodos de hidrolizado de biomasa lignocelulósica.

35 El documento WO00/03021 describe células microbianas modificadas metabólicamente mediante ingeniería que comprenden una actividad enzimática expresable que, cuando se expresa, puede proporcionar una alteración en el nivel redox de dicha célula.

40 El documento WO2004/048559 describe microorganismos modificados metabólicamente mediante ingeniería que tiene una primera ruta metabólica operativa en la que un primer metabolito se transforma en un segundo metabolito en una reacción en la que NAD es un cofactor para una primera enzima que produce NADH, transformándose el segundo metabolito en al menos un metabolito adicional en una reacción catalizada por una segunda enzima, y que tiene una segunda ruta metabólica operativa caracterizada por una actividad enzimática en exceso de un nivel nativo con respecto a una tercera enzima que cataliza una reacción irreversible en la que NADP es un cofactor y NADPH es un producto y en la que dicho primer metabolito se transforma en un dicho metabolito adicional sin la implicación de dicha segunda enzima.

50 Q.-X Kong *et al.* ("Overexpressing GLT1 in *gpd1Δ* mutant to improve the production of ethanol of *Saccharomyces cerevisiae*", Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 73, n.º 6, 5 de octubre de 2006, páginas 1382-1386) describen una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mutante, en la que se delecionó el gen GPD1, así como una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mutante en la que el gen GLT1 se colocó bajo el promotor PGK1 al tiempo que alberga una delección GPD1.

55 Q.-X Kong *et al.* ("Over-expressing GLT1 in a *gpd2A* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to improve the production of ethanol", Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 75, n.º 6, 16 de mayo de 2007, páginas 1361-1366) describen dos cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* en las que se delecionó el gen GPD2 usando un método de sustitución génica de una sola etapa para minimizar la formación de glicerol y mejorar la producción de etanol. Además, el gen GLT1 se sobreexpresó mediante un método de sustitución génica de dos etapas para superar el problema de desequilibrio redox en las cepas modificadas genéticamente.

60 L. Cao *et al.* ("Overexpression de GLT1 in *fps1ΔgpdΔ* mutant for optimum ethanol formation by *Saccharomyces cerevisiae*", Biomolecular Engineering, vol. 24, n.º 6, 23 de octubre de 2007, páginas 638-642) describen dos cepas de *S. cerevisiae* modificadas mediante ingeniería para una posible redirección del flujo de carbono del glicerol al etanol mediante la sobreexpresión de GLT1 en el mutante *fps1ΔgpdΔ*.

J. Nielsen ("Metabolic engineering", Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 55, n.º 3, 1 de abril de 2001, páginas 263-283) describe la modificación metabólica mediante ingeniería e incluye el análisis de la función celular y el diseño y la construcción de cepas mejoradas mediante ingeniería genética.

5 Z. Waks *et al* ("Engineering a Synthetic Dual-Organism System for Hydrogen Production", Applied and Environmental Microbiology, vol. 75, n.º 7, 1 de abril de 2009, páginas 1867-1875) describen la implementación de una ruta de sobreproducción de formiato en *Saccharomyces cerevisiae*. Describen la expresión de piruvato formiato liasa y la adición de AdhE, ambos de *E. coli*.

10 El documento WO03/078643 describe métodos para preparar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que produce etanol, que utiliza xilosa, que comprende genes para la sobreexpresión de xilosa reductasa, xilitol deshidrogenasa y xilulocinasa, en los que además de dichos genes, se introducen y opcionalmente se sobreexpresan los genes para la producción de fosfoacetiltransferasa y acetaldehído deshidrogenasa.

15 Un reto importante en relación con la estequiometría de la producción de etanol a base de levadura es que se forman invariablemente cantidades sustanciales de glicerol como subproducto. Se ha estimado que, en los procesos de etanol industriales típicos, hasta aproximadamente el 4% en peso de la materia prima de azúcar se convierte en glicerol (Nissen *et al*. Yeast 16 (2000) 463-474). En condiciones que son ideales para el crecimiento anaeróbico, la conversión en glicerol puede ser incluso superior, de hasta aproximadamente el 10%.

20 La producción de glicerol en condiciones anaerobias está vinculada principalmente al metabolismo redox. Durante el crecimiento anaeróbico de *S. cerevisiae*, se produce desasimilación de azúcar por medio de fermentación alcohólica. En este proceso, el NADH formado en la reacción glicolítica de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa vuelve a oxidarse mediante la conversión de acetaldehído, formado mediante la descarboxilación de piruvato en etanol por medio de alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. La estequiometría fija de esta ruta de desasimilación neutra en cuanto al redox provoca problemas cuando se produce una reducción neta de NAD⁺ a NADH en otra parte en el metabolismo. En condiciones anaerobias, la nueva oxidación de NADH en *S. cerevisiae* depende estrictamente de la reducción de azúcar a glicerol. La formación de glicerol se inicia mediante la reducción del producto intermedio glicolítico dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato, una reacción catalizada por glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. Posteriormente, el glicerol 3-fosfato formado en esta reacción se hidroliza mediante glicerol-3-fosfatasa para dar glicerol y fosfato inorgánico. Por consiguiente, el glicerol es un subproducto importante durante la producción anaeróbica de etanol mediante *S. cerevisiae*, lo cual no se desea ya que reduce la conversión global de azúcar a etanol. Además, la presencia de glicerol en los efluentes de las plantas de producción de etanol puede imponer costes para el tratamiento de aguas residuales.

35 Es un objeto de la invención proporcionar una célula recombinante novedosa, que sea adecuada para la producción fermentativa, anaeróbica, de etanol a partir de un carbohidrato, en particular un carbohidrato obtenido de biomasa lignocelulósica, que tenga una producción de glicerol reducida en comparación con su organismo de tipo silvestre correspondiente o que careza de producción de glicerol si la célula se usa para la preparación fermentativa de etanol.

40 Es un objeto adicional proporcionar un método novedoso para preparar de manera fermentativa etanol en cultivos de levadura anaerobios, método en el que no se forma glicerol, o en el que al menos se produce menos glicerol que en un método que hace uso de cepas conocidas de *S. cerevisiae*.

45 Uno o más objetos adicionales que pueden alcanzarse resultan evidentes a partir de la descripción y/o las reivindicaciones.

50 Los inventores se han dado cuenta de que es posible cumplir uno o más de estos objetivos proporcionando una célula recombinante específica en la que se ha incorporado una actividad enzimática distinta específica, que permite la nueva oxidación del NADH formado en la fermentación de un carbohidrato, también en ausencia de la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH.

55 Por consiguiente, la presente invención se refiere a una célula de levadura recombinante, la célula que comprende una o más secuencias de ácido nucleico recombinantes, en particular heterólogas, que codifican para una proteína que tiene actividad acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.10), careciendo dicha célula de la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH, o teniendo la célula una actividad enzimática reducida con respecto a la síntesis de glicerol dependiente de NADH en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, estando dicha célula libre de actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD o teniendo actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD reducida en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, y/o estando la célula o bien libre de actividad glicerol fosfato fosfatasa o teniendo actividad glicerol fosfato fosfatasa reducida en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, y que comprende una mutación genómica en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en GPD1, GPD2, GPP1 y GPP2, y comprendiendo la célula de levadura una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una proteína que tiene actividad acetil-coenzima A

sintetasa (EC 6.2.1.1) y una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una proteína que tiene actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (EC 1.1.1.1).

5 Los inventores se han dado cuenta en particular de que resulta ventajoso proporcionar una célula sin actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH o una célula con actividad enzimática reducida necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH.

La invención se refiere además al uso de una célula según la invención para la preparación de etanol.

10 En particular, la invención se refiere además a un método para preparar etanol, que comprende preparar etanol a partir de un carbohidrato fermentable y a partir de acetato, preparación que se lleva a cabo en condiciones fermentativas anaerobias usando una célula de levadura, expresando dicha célula actividad acetil-coenzima A sintetasa y actividad acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺, careciendo dicha célula preferiblemente de la actividad enzimática necesaria para la ruta bioquímica para la síntesis de glicerol a partir de un carbohidrato o teniendo una actividad enzimática reducida con respecto a la ruta bioquímica para la síntesis de glicerol a partir de un carbohidrato en comparación con una célula de *S. cerevisiae* de tipo silvestre.

20 Ventajosamente, según la invención se produce etanol en una razón molar de glicerol:etanol de menos de 0,04:1, en particular de menos de 0,02:1, preferiblemente de menos de 0,01:1. La producción de glicerol puede estar ausente (se indetectable), aunque al menos en algunas realizaciones (en la que la síntesis de glicerol dependiente de NADH se reduce, pero no se prohíbe completamente) puede producirse algo de glicerol como producto secundario, por ejemplo, en una razón de glicerol con respecto a etanol de 0,001:1 o más.

25 La Figura 1 muestra esquemáticamente un procedimiento de modificación genética que puede llevarse a cabo como parte de la producción de una célula según la invención.

30 La Figura 2 muestra concentraciones de biomasa y productos en cultivos en lotes anaeróbicos de diferentes cepas de *S. cerevisiae* sobre glucosa (20 g l⁻¹). El ácido acético (2,0 g l⁻¹) estaba presente desde el inicio de la fermentación (panel A, B) o se añadió en el punto de tiempo indicado mediante la flecha (panel C, D). Condiciones de crecimiento: T = 30°C, pH 5,0. Símbolos: ▲, densidad óptica a 660 nm; ●, glucosa; ○, etanol; ■, acetato; □, glicerol. Cada gráfico representa valores de una de dos repeticiones independientes, que proporcionaron datos que diferían en menos de, 5%. Panel A: *S. cerevisiae* IME076 (*GPD1 GPD2*). Panel B: *S. cerevisiae* IMZ132 (*gpd1Δ gpd2Δ* que sobreexpresa el gen *mhpF* de *E. coli*). Panel C: *S. cerevisiae* IMZ132 (*gpd1Δ gpd2Δ* que sobreexpresa el gen *mhpF* de *E. coli*). Panel D: *S. cerevisiae* IMZ127 (*gpd1Δ gpd2Δ*) que se hizo crecer sobre glucosa (20 g.l⁻¹).

35 La presente invención permite la eliminación completa de la producción de glicerol, o al menos una reducción significativa de la misma, proporcionando una célula de levadura recombinante, en particular *S. cerevisiae*, de modo que puede volver a oxidar el NADH mediante la reducción de ácido acético a etanol por medio de reacciones dependientes de NADH.

40 Esto no es solo ventajoso porque se evita o al menos se reduce la producción de glicerol, sino porque el producto formado en la nueva oxidación de NADH es también el producto deseado, concretamente etanol, un método de la invención también puede ofrecer un rendimiento de producto aumentado (determinado como el % en peso de materia prima convertida, es decir, carbohidrato más ácido acético, que se convierte en etanol).

45 Dado que el ácido acético está disponible generalmente en cantidades significativas en hidrolizados lignocelulósicos, esto hace que la presente invención resulte particularmente ventajosa para la preparación de etanol usando biomasa lignocelulósica como fuente para el carbohidrato fermentable. Además, las fuentes de carbohidrato que pueden contener una cantidad considerable de acetato incluyen melaza de remolacha azucarera (hidrolizados de) y que contienen almidón (por ejemplo, productos de desecho de procesos de molienda en seco de maíz, de procesos de molienda en húmedo de maíz; de procesos de residuos de almidón, por ejemplo, con recirculaciones de destilación). La invención contribuye a una disminución de los niveles del compuesto inhibidor ácido acético y una fracción más grande del hidrolizado pasa a ser realmente un sustrato para la producción del etanol.

50 Se han conseguido buenos resultados con una célula de levadura sin actividad enzimática observable necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH, tal como se ilustra en el ejemplo. Sin embargo, los inventores contemplan que también pueda usarse ventajosamente una célula de levadura según la invención que tenga actividad de síntesis de glicerol dependiente de NADH para, por ejemplo, la producción de etanol. Se contempla que tal célula pueda usar acetato para volver a oxidar al menos parte del NADH. De ese modo, el acetato puede competir con la ruta de síntesis de glicerol dependiente de NADH y por tanto reducir potencialmente la síntesis de glicerol. Además, el acetato presente en una materia prima usada para la producción de etanol, tal como un hidrolizado lignocelulósico, puede convertirse en etanol, aumentando de ese modo el rendimiento de producto.

60 El término "un" o "una" tal como se usa en el presente documento se define como "al menos un/una" a menos que se especifique lo contrario.

Cuando se haga referencia a un nombre (por ejemplo, un compuesto, un aditivo, etc.) en singular, se pretende que esté incluido el plural. Por tanto, cuando se haga referencia a un resto específico, por ejemplo, "compuesto", esto significa "al menos uno" de ese resto, por ejemplo, "al menos un compuesto", a menos que se especifique lo contrario.

5

El término "o" tal como se usa en el presente documento debe entenderse como "y/o".

Cuando en el presente documento se haga referencia a un carboxilato, por ejemplo, acetato, se pretende que se incluya el ácido carboxílico correspondiente (su ácido conjugado) así como una sal del mismo, y viceversa.

10

Cuando se haga referencia a un compuesto del que existen varios isómeros (por ejemplo, un enantiómero D y uno L), el compuesto incluye en principio todos los enantiómeros, diastereómeros e isómeros cis/trans de ese compuesto que puedan usarse en el método particular de la invención; en particular cuando se haga referencia a un compuesto de este tipo, incluye el/los isómero(s) natural(es).

15

El término "fermentación", "fermentativo" y similares se usa en el presente documento en un sentido clásico, es decir, para indicar que un proceso se lleva o se ha llevado a cabo en condiciones anaerobias. Las condiciones anaerobias se definen en el presente documento como condiciones sin nada oxígeno o en las que esencialmente no se consume oxígeno por parte de la célula de levadura, en particular una célula de levadura, y habitualmente corresponde a un consumo de oxígeno de menos de 5 mmol/l.h, en particular a un consumo de oxígeno de menos de 2,5 mmol/l.h, o menos de 1 mmol/l.h. Esto corresponde habitualmente a una concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo de menos del 5% de saturación de aire, en particular a una concentración de oxígeno disuelto de menos del 1% de saturación de aire, o menos del 0,2% de saturación de aire.

20

25

El término "levadura" o "célula de levadura" se refiere a un grupo filogenéticamente diverso de hongos unicelulares, la mayoría de los cuales están en la división de *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Las levaduras en gemación ("levaduras verdaderas") están clasificadas en el orden *Saccharomycetales*, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la especie más ampliamente conocida.

30

El término "(célula) recombinante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cepa (célula) que contiene ácido nucleico que es el resultado de una o más modificaciones genéticas usando técnica(s) de ADN recombinante y/u otra(s) técnica(s) mutagénica(s). En particular una célula recombinante puede comprender ácido nucleico no presente en una célula de tipo silvestre correspondiente, ácido nucleico que se ha introducido en esta cepa (célula) usando técnicas de ADN recombinante (una célula transgénica), o ácido nucleico no presente en dicho tipo silvestre es el resultado de una o más mutaciones - por ejemplo usando técnicas de ADN recombinante u otra técnica de mutagénesis, tal como irradiación UV - en una secuencia de ácido nucleico presente en dicho tipo silvestre (tal como un gen que codifica para un polipéptido de tipo silvestre) o habiéndose modificado la secuencia de ácido nucleico de un gen para seleccionar como diana el producto polipeptídico (que codifica para el mismo) hacia otro compartimento celular. Además, el término "(célula) recombinante" se refiere en particular a una cepa (célula) de la que se han retirado secuencias de ADN usando técnicas de ADN recombinante.

35

40

El término "célula (de levadura) transgénica" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cepa (célula) que contiene ácido nucleico que no se produce de manera natural en esta cepa (célula) y que se ha introducido en esta cepa (célula) usando técnicas de ADN recombinante, es decir, una célula recombinante).

45

El término "mutado" tal como se usa en el presente documento en relación con proteínas o polipéptidos significa que al menos un aminoácido en la secuencia de proteína o de polipéptido de tipo silvestre o que se produce de manera natural se ha sustituido por un aminoácido diferente, insertado o delecionado de la secuencia por medio de mutagénesis de ácidos nucleicos que codifican para estos aminoácidos. La mutagénesis es un método ampliamente conocido en la técnica, e incluye, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio por medio de PCR o por medio de mutagénesis mediada por oligonucleótidos tal como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3 (1989). El término "mutado" tal como se usa en el presente documento en relación con genes significa que al menos un nucleótido en la secuencia de ácido nucleico de ese gen o una secuencia reguladora del mismo, se ha sustituido por un nucleótido diferente, o se ha delecionado de la secuencia por medio de mutagénesis, dando como resultado la transcripción de una secuencia de proteína con una función alterada cualitativamente o cuantitativamente o la variedad desactivada de ese gen.

50

55

El término "gen", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que contiene un molde para una ácido nucleico polimerasa, en eucariotas, ARN polimerasa II. Los genes se transcriben a ARNm que se traducen entonces en proteína.

60

El término "ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido, es decir, un polinucleótido, en forma o bien monocatenaria o bien bicatenaria, y a menos que se limite de otra forma, abarca los análogos conocidos que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales porque se hibridan para dar ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a los nucleótidos que se producen de manera natural (por ejemplo, ácidos nucleicos de péptido). Un polinucleótido puede

65

ser una secuencia de longitud completa o una subsecuencia de un gen regulador o estructura heterólogo o nativo. A menos que se indique lo contrario, el término incluye la referencia a la secuencia especificada, así como la secuencia complementaria de la misma. Por tanto, los ADN o ARN con estructuras básicas modificadas por motivos de estabilidad o por otros motivos son "polinucleótidos" tal como se pretende ese término en el presente documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solo dos ejemplos, son polinucleótidos tal como se usa el término en el presente documento. Se apreciará que se han hecho una gran variedad de modificaciones a ADN y ARN que sirven para muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la técnica. El término polinucleótido tal como se emplea en el presente documento abarca tales formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de polinucleótidos, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo entre otras cosas, células simples y complejas.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos son aplicables a polímeros de aminoácido en los que uno o más residuos de aminoácido es un análogo químico artificial de un aminoácido que se produce de manera natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácido que se producen de manera natural. La naturaleza esencial de tales análogos de aminoácidos que se producen de manera natural es que, cuando se incorporan a una proteína, esta proteína es reactiva específicamente a anticuerpos obtenidos de la misma proteína pero que consisten enteramente de aminoácidos que se producen de manera natural. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también incluyen modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, unión lipídica, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP.

Cuando se menciona una enzima con referencia a una clase de enzimas (EC), la clase de enzimas es una clase en la que la enzima está clasificada o puede clasificarse, basándose en la Nomenclatura de enzimas proporcionada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), nomenclatura que puede encontrarse en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Otras enzimas adecuadas que (aún) no se han clasificado en una clase específica, pero pueden clasificarse como tal, pretenden estar incluidas.

Si en el presente documento se hace referencia a una proteína o una secuencia de ácido nucleico, tal como un gen, mediante referencia a un número de registro, este número en particular se usa para hacer referencia a una proteína o secuencia de ácido nucleico (gen) que tiene una secuencia tal como pueden encontrarse a través de www.ncbi.nlm.nih.gov/, (tal como está disponible el 13 de julio de 2009) a menos que se especifique lo contrario.

Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica para un polipéptido también, mediante referencia al código genético, describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. El término "variantes modificadas de manera conservativa" es aplicable a secuencias tanto de aminoácido como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican para variantes idénticas o modificadas de manera conservativa de las secuencias de aminoácidos debido a la degeneración del código genético. El término "degeneración del código genético" se refiere al hecho de que un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican para cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos para el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que una alanina se especifica mediante un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas" y representan una especie de variación modificada de manera conservativa.

El término "homólogo funcional" (o abreviado "homólogo") de un polipéptido que tiene una secuencia específica (por ejemplo, SEQ ID NO: 2), tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende dicha secuencia específica con la condición de que uno o más aminoácidos están sustituidos, deletados, añadidos y/o insertado, y polipéptido que tiene (cualitativamente) la misma funcionalidad enzimática para la conversión de sustrato, por ejemplo un homólogo de actividad de acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.10) puede convertir acetaldehído en etanol. Esta funcionalidad puede someterse a prueba mediante el uso de un sistema de ensayo que comprende una célula de levadura recombinante que comprende un vector de expresión para la expresión del homólogo en levadura, comprendiendo dicho vector de expresión una secuencia de ácido nucleico heteróloga unida de manera operativa a un promotor funcional en la levadura y codificando dicha secuencia de ácido nucleico heteróloga para el polipéptido homólogo cuya actividad enzimática para convertir acetil-coenzima A en acetaldehído en la célula de levadura debe someterse a prueba, y evaluando si se produce dicha conversión en dichas células. Pueden identificarse homólogos candidatos usando análisis de similitud *in silico*. Un ejemplo detallado de un análisis de este tipo se describe en el ejemplo 2 del documento WO2009/013159. El experto en la técnica podrá derivar del mismo cómo pueden encontrarse homólogos candidatos adecuados y, opcionalmente tras la optimización de (pares de) codones, podrá someter a prueba la funcionalidad requerida de tales homólogos candidatos usando un sistema de ensayo adecuado tal como se describió anteriormente. Un homólogo adecuado representa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos similar a un polipéptido específico de más del 50%, preferiblemente del 60% o más, en particular de al menos el 70%, más en particular de al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, por ejemplo que tiene una similitud de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 2 tal, y que

tiene la funcionalidad enzimática requerida para convertir acetil-coenzima A en acetaldehído. Con respecto a secuencias de ácido nucleico, el término homólogo funcional pretende incluir secuencias de ácido nucleico que difieren de otra secuencia de ácido nucleico debido a la degeneración del código genético y codifican para la misma secuencia de polipéptido.

La identidad de secuencia se define en el presente documento como una relación entre dos o más secuencias de aminoácido (polipéptido o proteína) o dos o más secuencias de ácido nucleico (polinucleótido), tal como se determina comparando las secuencias. Habitualmente, las identidades o similitudes de secuencia se comparan por toda la longitud de las secuencias comparadas. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o ácido nucleico, según sea el caso, tal como se determina mediante la coincidencia entre cadenas de tales secuencias.

Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, por ejemplo, los BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), disponibles públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894). Parámetros preferidos para la comparación de secuencias de aminoácidos usando BLASTP son hueco abierto 11,0, hueco extendido 1, matriz Blosum 62.

"Expresión" se refiere a la transcripción de un gen en ARN estructural (ARNr, ARNt) o ARN mensajero (ARNm) con la posterior traducción en una proteína.

Tal como se usa en el presente documento, "heterólogo" en referencia a un ácido nucleico o proteína es un ácido nucleico o proteína que se origina de una especie extraña, o, si es de la misma especie, está modificada sustancialmente con respecto a su forma nativa en composición y/o locus genómico mediante intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor unido de manera operativa a un gen estructural heterólogo es de una especie diferente de la que se derivó el gen estructural, o, si es de la misma especie, uno o ambos están modificados sustancialmente con respecto a su forma original. Una proteína heteróloga puede originarse de una especie extraña o, si es de la misma especie, está modificada sustancialmente con respecto a su forma original mediante intervención humana deliberada.

El término "expresión heteróloga" se refiere a la expresión de ácidos nucleicos heterólogos en una célula huésped. La expresión de proteínas heterólogas en sistemas de células huésped eucarióticas, tales como de levadura, se conocen ampliamente para los expertos en la técnica. Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico de un gen que codifica para una enzima con una actividad específica puede expresarse en un sistema eucariótico de este tipo. En algunas realizaciones, pueden emplearse células de levadura transformadas/transfectadas como sistemas de expresión para la expresión de las enzimas. La expresión de proteínas heterólogas en levadura se conoce ampliamente. Sherman, F., *et al.*, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) es un trabajo ampliamente reconocido que describe los diversos métodos disponibles para expresar proteínas en levadura. Dos levaduras utilizadas ampliamente son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Vectores, cepas y protocolos para la expresión en *Saccharomyces* y *Pichia* se conocen en la técnica y están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, Invitrogen). Los vectores adecuados tienen habitualmente secuencias de control de expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfoglicerato cinasa o alcohol oxidasa, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee.

Tal como se usa en el presente documento "promotor" es una secuencia de ADN que dirige la transcripción de un gen (estructural). Normalmente, un promotor está ubicado en la región 5' de un gen, proximal a el sitio de iniciación transcripcional de un gen (estructural). Las secuencias promotoras pueden ser constitutivas, inducibles o reprimibles. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente de inducción.

El término "vector", tal como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un vector de expresión autosómico y a un vector de integración usado para la integración en el cromosoma.

El término "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica para un polipéptido de interés bajo el control de (es decir, unido operativamente a) segmentos de ácido nucleico adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y de terminación, y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos. En particular, un vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende en la dirección de 5' a 3' y unidas operativamente: (a) una región de iniciación de transcripción y traslación reconocida por levadura, (b) una secuencia codificante para un polipéptido de interés, y (c) una región de terminación de transcripción y traslación reconocida por levadura. "Plásmido" se refiere a ADN extracromosómico que se replica de manera autónoma que no está integrado en el genoma de un microorganismo y es habitualmente de naturaleza circular.

Un “vector de integración” se refiere a una molécula de ADN, lineal o circular, que puede incorporarse al genoma de un microorganismo y proporciona la herencia estable de un gen que codifica para un polipéptido de interés. El vector de integración comprende generalmente uno o más segmentos que comprenden una secuencia génica que codifica para un polipéptido de interés bajo el control de (es decir, unido operativamente a) segmentos de ácido nucleico adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y de terminación, y uno o más segmentos que impulsan la incorporación del gen de interés al genoma de la célula diana, habitualmente mediante el proceso de recombinación homóloga. Normalmente, el vector de integración será uno que puede transferirse a la célula diana, pero que tiene un replicón que no es funcional en ese organismo. La integración del segmento que comprende el gen de interés puede seleccionarse si se incluye un marcador apropiado dentro de ese segmento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “unido operativamente” se refiere a una juxtaposición en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera pretendida. Una secuencia control “unida operativamente” a otra secuencia control y/o a una secuencia codificante está ligada de tal manera que se consigue la transcripción y/o expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con la secuencia control. Generalmente, unidas operativamente significa que las secuencias de ácido nucleico que están unidas son contiguas y, cuando sea necesario para juntar dos regiones codificantes de proteína, son contiguas y están en el mismo marco de lectura.

Por “célula huésped” quiere decirse una célula que contiene un vector y soporta la replicación y/o expresión del vector. Las células huésped pueden ser células procariotas, tal como *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levadura, insecto, anfibio o mamífero. Preferiblemente, las células huésped son células del orden de *Actinomycetales*, lo más preferiblemente células de levadura, lo más preferiblemente células de *Saccharomyces cerevisiae*.

“Transformación” y “transformar”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independiente del método usado para la inserción, por ejemplo, captación directa, transducción, apareamiento o electroporación. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o alternativamente, puede integrarse en el genoma de la célula huésped.

Una célula según la invención se selecciona preferiblemente del grupo de *Saccharomycetaceae*, más preferiblemente del grupo de células de *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y células de *Kluyveromyces*. En particular se han conseguido buenos resultados con una célula huésped de *Saccharomyces cerevisiae*. *Zygosaccharomyces baillii* es otra célula preferida particularmente, especialmente para su alta tolerancia de acetato y su alta tolerancia de etanol.

Además, una célula según la invención puede ser una célula de levadura seleccionada del grupo de levaduras que fermentan xilosa, más preferiblemente una especie de *Pichia*, por ejemplo, *Pichia stipitis* o *Pichia angusta* (también conocida como *Hansenula polymorpha*).

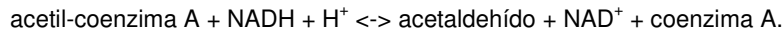
En una realización adicional, una célula huésped según la invención es una célula huésped que carece de manera natural de la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH, por ejemplo, células de levadura que pertenecen a la especie *Brettanomyces intermedius*.

Una actividad enzimática reducida puede conseguirse modificando uno o más genes que codifican para una actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD (GPD) o uno o más genes que codifican para una actividad glicerol fosfato fosfatasa (GPP), de modo que la enzima se expresa considerablemente menos que en el tipo silvestre o de modo que el gen codificó para un polipéptido con actividad reducida. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo usando técnicas biotecnológicas conocidas comúnmente, y pueden incluir en particular una o más mutaciones de desactivación o mutagénesis dirigida al sitio de regiones promotoras o regiones codificantes de los genes estructurales que codifican para GPD y/o GPP. Alternativamente, cepas de levadura que son defectuosas en la producción de glicerol pueden obtenerse mediante mutagénesis aleatoria seguida de selección de cepas con actividad reducida o ausente de GPD y/o GPP. Los genes *GDP1*, *GDP2*, *GPP1* y *GPP2* de *S. cerevisiae* se muestran en SEQ ID NO: 24-27.

Preferiblemente al menos un gen que codifica para un GPD o al menos un gen que codifica para un GPP está deletado en su totalidad, o al menos está deletada una parte del gen que codifica para una parte de la enzima que es esencial para su actividad. En particular, se han conseguido buenos resultados con una célula de *S. cerevisiae*, habiéndose inactivado los marcos de lectura abiertos del gen *GPD1* y del gen *GPD2*. La inactivación de un gen estructural (gen diana) puede llevarse a cabo por un experto en la técnica sintetizando sintéticamente o construyendo de otro modo un fragmento de ADN que consiste en un gen marcador seleccionable flanqueado por secuencias de ADN que son idénticas a secuencias que flanquean la región del genoma de la célula huésped que debe deletarse. En particular, se han obtenido buenos resultados con la inactivación de los genes *GPD1* y *GPD2* en *Saccharomyces cerevisiae* mediante la integración de los genes marcadores *kanMX* y *hphMX4*. Posteriormente

este fragmento de ADN se transforma en una célula huésped. Las células transformadas que expresan el gen marcador dominante se comprueban para determinar la sustitución correcta de la región que se diseñó para ser deletada, por ejemplo, mediante una reacción en cadena de la polimerasa diagnóstica o hibridación de tipo Southern.

Tal como se indicó anteriormente, una célula según la invención comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica para una acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante, dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.10). Esta enzima cataliza la conversión de acetil-coenzima A en acetaldéhidó. Esta conversión puede representarse mediante la fórmula de reacción de equilibrio:



Por tanto, esta enzima permite la nueva oxidación de NADH cuando se genera acetil-coenzima A a partir del acetato presente en el medio de crecimiento, y de ese modo la síntesis de glicerol ya no es necesaria para el equilibrio de cofactores redox.

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ puede originarse en principio de cualquier organismo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha deshidrogenasa.

Las acetaldéhidó deshidrogenasas acetilantes dependientes de NAD⁺ conocidas que pueden catalizar la reducción dependiente de NADH de acetil-coenzima A a acetaldéhidó pueden dividirse en general en tres tipos de homólogos funcionales de acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺:

1) Proteínas bifuncionales que catalizan la conversión reversible de acetil-coenzima A en acetaldéhidó, y la conversión reversible posterior de acetaldéhidó en etanol. Un ejemplo de este tipo de proteínas es la proteína AdhE en *E. coli* (n.º Gen Bank: NP_415757). AdhE parece ser el producto de evolución de una fusión génica. La región NH₂-terminal de la proteína AdhE es altamente homóloga a aldehído:NAD⁺ oxidoreductasas, mientras que la región COOH-terminal es homóloga a una familia de etanol:NAD⁺ oxidoreductasas dependientes de Fe²⁺ (Membrillo-Hernandez *et al.*, (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 33869-33875). La AdhE de *E. coli* se somete a oxidación catalizada por metal y por tanto sensible al oxígeno (Tamarit *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273:3027-32).

2) Proteínas que catalizan la conversión reversible de acetil-coenzima A en acetaldéhidó en microorganismos estrictamente anaeróbicos o anaeróbicos facultativos, pero no presentan actividad alcohol deshidrogenasa. Un ejemplo de este tipo de proteínas se ha notificado en *Clostridium kluyveri* (Smith *et al.* (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 203: 663-675). Una acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante se ha anotado en el genoma de *Clostridium kluyveri* DSM 555 (n.º GenBank: EDK33116). Una proteína homóloga AcdH se identifica en el genoma de *Lactobacillus plantarum* (n.º GenBank: NP_784141). Otro ejemplo de este tipo de proteínas es dicho producto génico en *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 (Toth *et al.* (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4973-4980, n.º GenBank: AAD31841).

3) Proteínas que forman parte de un complejo aldolasa-deshidrogenasa bifuncional implicado en el catabolismo de 4-hidroxi-2-cetovaleato. Tales enzimas bifuncionales catalizan las dos etapas finales de la ruta de metaescisión para catecol, un producto intermedio en muchas especies bacterianas en la degradación de fenoles, toluatos, naftaleno, bifenilos y otros compuestos aromáticos (Powlowski y Shingler (1994) *Biodegradation* 5, 219-236). El 4-hidroxi-2-cetovaleato se convierte en primer lugar mediante 4-hidroxi-2-cetovaleato aldolasa en piruvato y acetaldéhidó, posteriormente se convierte acetaldéhidó mediante acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante en acetil-CoA. Un ejemplo de este tipo de acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante es la proteína DmpF en *Pseudomonas* sp CF600 (n.º GenBank: CAA43226) (Shingler *et al.* (1992) *J. Bacteriol.* 174:71 1-24). La proteína MphF de *E. coli* (Ferrandez *et al.* (1997) *J. Bacteriol.* 179: 2573-2581, n.º GenBank: NP_414885) es homóloga a la proteína DmpF en *Pseudomonas* sp. CF600.

Una secuencia de ácido nucleico adecuada puede encontrarse en particular en un organismo seleccionado del grupo de *Escherichia*, en particular *E. coli*; *Mycobacterium*, en particular *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium tuberculosis*; *Carboxidothermus*, en particular *Carboxidothermus hydrogenoformans*; *Entamoeba*, en particular *Entamoeba histolytica*; *Shigella*, en particular *Shigella sonnei*; *Burkholderia*, en particular *Burkholderia pseudomallei*, *Klebsiella*, en particular *Klebsiella pneumoniae*; *Azotobacter*, en particular *Azotobacter vinelandii*; *Azoarcus* sp; *Cupriavidus*, en particular *Cupriavidus taiwanensis*; *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas* sp. CF600; *Pelotomaculum*, en particular *Pelotomaculum thermopropionicum*. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ se origina de *Escherichia*, más preferiblemente de *E. coli*.

Particularmente adecuado es un gen *mhpF* de *E. coli*, o un homólogo funcional del mismo. Este gen se describe en Ferrández *et al.* (1997) *J. Bacteriol.* 179:2573-2581. Se han obtenido buenos resultados con *S. cerevisiae*, habiéndose incorporado un gen *mhpF* de *E. coli*.

En una realización ventajosa adicional, la secuencia de ácido nucleico que codifica para una acetaldéhidó deshidrogenasa (acetilante) es de, en particular *Pseudomonas. dmpF* de *Pseudomonas sp. CF600*.

5 En principio, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante, dependiente de NAD⁺ puede ser una secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre.

10 Una secuencia de ácido nucleico preferida codifica para la acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante, dependiente de NAD⁺, representada mediante SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 29, o un homólogo funcional de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 29. En particular, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia según SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 28 o un homólogo funcional de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 28.

15 Además, una acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante (o secuencia de ácido nucleico que codifica para tal actividad) puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo de *Escherichia coli adhE*, *Entamoeba histolytica adh2*, *Staphylococcus aureus adhE*, *Piromyces sp.E2 adhE*, *Clostridium kluyveri EDK33116*, *Lactobacillus plantarum acdH* y *Pseudomonas putida YP 001268189*. Para secuencias de estas enzimas, secuencias de ácido nucleico que codifican para estas enzimas y metodología para incorporar la secuencia de ácido nucleico a una célula huésped, se hace referencia al documento WO 2009/013159, en particular ejemplo 3, table 1 (página 26) y los números de ID de secuencia mencionados en el mismo.

20 Una célula según la invención también comprende una acetil-coenzima A sintetasa, enzima que cataliza la formación de acetil-coenzima A a partir de acetato. Esta enzima puede estar presente en la célula de tipo silvestre, tal como es el caso, por ejemplo, con *S. cerevisiae* que contiene dos isoenzimas acetil-coenzima A sintetasa codificada por los genes *ACS1* [SEQ ID NO: 17] y *ACS2* [SEQ ID NO: 18] (van den Berg *et al* (1996) J. Biol. Chem. 271:28953-28959), o una célula huésped puede dotarse de uno o más genes heterólogos que codifican para esta actividad, por ejemplo, el gen *ACS1* y/o *ACS2* de *S. cerevisiae* o un homólogo funcional del mismo puede incorporarse a una célula que carece de actividad de isoenzima acetil-coenzima A sintetasa.

30 Además, en particular en vista de una producción de etanol eficiente, pero también para una oxidación de NADH eficiente, la célula comprende una alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (EC 1.1.1.1). Esta enzima cataliza la conversión de acetaldéhidó a etanol. La célula puede comprender de manera natural un gen que codifica para una deshidrogenasa de este tipo, tal como es el caso con *S. cerevisiae* (*ADH1-5*) [SEQ ID NO: 19-23], véase "Lutstorf y Megnet. 1968 Arch. Biochem. Biophys. 126:933-944", o "Ciriacy, 1975, Mutat. Res. 29:315-326", o una célula huésped puede dotarse de uno o más genes heterólogos que codifican para esta actividad, por ejemplo, cualquiera o cada uno de los genes *ADH1-5* de *S. cerevisiae* u homólogos funcionales de los mismos pueden incorporarse a una célula que carece de actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺.

35 Células específicamente preferidas según la invención son células de la cepa *S. cerevisiae* depositada el 16 de julio de 2009 en el *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (Utrecht, Países Bajos) con el número de depósito CBS125049.

40 También se describe un método de preparación de una célula de levadura recombinante según la invención.

45 La modificación genética de una célula, que comprende la incorporación de una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas en una célula huésped, y que comprende habitualmente la mutación (incluyendo la delección completa) de un gen que codifica para una actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH, puede basarse en el conocimiento general común, por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular y genética convencionales tal como se conocen generalmente en la técnica y se han descrito previamente (por ejemplo, Maniatis *et al.* 1982 "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Miller 1972 "Experiments in molecular genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Sambrook y Russell 2001 "Molecular cloning: a laboratory manual" (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press; F. Ausubel *et al.*, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York 1987).

55 Un método para preparar una célula de levadura recombinante según la invención, comprende

(a) proporcionar una célula de levadura, preferiblemente una célula de levadura seleccionada del grupo de células de levadura que carecen de la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH y una célula de levadura que tiene una actividad enzimática reducida con respecto a la síntesis de glicerol en comparación con su célula de levadura de tipo silvestre correspondiente;

60 (b) obtener un segmento de ácido nucleico que comprende un gen que es heterólogo con respecto a dicha célula de levadura y codificada para una enzima que tiene actividad acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺, y estando unido dicho gen de manera operativa a un promotor funcional en dicha célula de levadura;

65 (c) si se desea (por ejemplo, si la célula de levadura carece de actividad acetil-coenzima A sintetasa o en la que la actividad de acetil-coenzima A sintetasa(s) está limitando la actividad *in vivo* global de la ruta para la conversión de

acetato en etanol o expresa acetil-coenzima A sintetasa en un compartimento celular que no es compatible con su uso en la invención), obteniendo un segmento de ácido nucleico que comprende un gen que es heterólogo con respecto a dicha célula de levadura y codifica para una enzima que tiene una actividad acetil-coenzima A sintetasa, y estando dicho gen unido de manera operativa a un promotor funcional en dicha célula de levadura;

(d) si se desea (por ejemplo, si la célula de levadura carece de actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ o en la que la actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ está limitando la actividad *in vivo* de la ruta para la conversión de acetato en etanol o expresa alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ en un compartimento celular que no es compatible con su uso en la invención), obteniendo un segmento de ácido nucleico que comprende un gen que es heterólogo con respecto a dicha célula de levadura y codifica para una enzima que tiene una actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, y estando dicho gen unido de manera operativa a un promotor funcional en dicha célula de levadura; y

(e) transformar una célula de levadura con dicho segmento de ácido nucleico o segmentos proporcionando de ese modo una célula de levadura recombinante que expresa dicho gen heterólogo y presentando dicha célula de levadura recombinante una síntesis de glicerol dependiente de NADH reducida en condiciones fermentativas en comparación con una célula de levadura no recombinante correspondiente o estando ausente la síntesis de glicerol dependiente de NADH en condiciones fermentativas en dicha célula de levadura.

En la técnica se conocen promotores para células de levadura y pueden ser, por ejemplo, los promotores de triosa fosfato deshidrogenasa *TPI1*, promotores de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa *TDH3*, promotores de elongación traslacional EF-1 alfa *TEF1*, promotores de alcohol deshidrogenasa *ADH1*, promotores de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa *gpdA* y *ZWF1*, promotores de proteasa tales como *pepA*, *pepB*, *pepC*, los promotores de la glucoamilasa *glaA*, promotores de amilasa *amyA*, *amyB*, los promotores de catálisis *catR* o *catA*, promotor de glucosa oxidasa *goxC*, promotor de beta-galactosidasa *lacA*, promotor de alfa-glucosidasa *aglA*, promotor de factor de elongación traslacional *tefA*, promotores xilanasa, tales como *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, *xlnD*, promotores de celulasa, tales como *eglA*, *eglB*, *cbhA*, promotores de reguladores transcripcionales tales como *areA*, *creA*, *xlnR*, *pacC*, *prfT*, etc. o cualquier otro, y pueden encontrarse entre otros en el sitio web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>).

En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico heteróloga que debe introducirse en una célula de levadura cuando se prepara una célula de levadura recombinante de la invención, se incorpora a un vector, y la transformación de la célula se lleva a cabo con el vector. Si debe incorporarse más de una secuencia de ácido nucleico heteróloga (que codifican para diferentes actividades enzimáticas o que codifican conjuntamente para una única actividad enzimática), estas secuencias de ácido nucleico pueden estar presentes en un único vector o estas secuencias de ácido nucleico pueden incorporarse como parte de vectores independientes.

Por consiguiente, se describe adicionalmente un vector para la expresión de un polipéptido heterólogo en una célula de levadura, en particular una célula de levadura, comprendiendo dicho vector de expresión una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas unidas de manera operativa a un promotor funcional en la célula de levadura y codificando dicha(s) secuencia(s) de ácido nucleico heteróloga(s) para un polipéptido que tiene actividad enzimática para convertir acetil-coenzima A en acetaldehído en (el citosol de) dicha célula de levadura, comprendiendo dicho polipéptido preferiblemente una secuencia según SEQ ID NO: 2 o un homólogo funcional de la misma.

El vector (usado en un método) de la invención puede ser un vector de fago, un vector bacteriano, un vector de plásmido integrante, episómico o centromérico o un vector viral.

En una realización preferida, el vector es un vector para la expresión en *Saccharomyces*, en particular *S. cerevisiae*. En tal realización, la secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica para actividad acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ puede estar optimizada para (un par de) codones para la expresión en *Saccharomyces*, en particular *S. cerevisiae*, aunque se han conseguido buenos resultados con un tipo silvestre que codifica para una secuencia de ácido nucleico.

Con el fin de conseguir una expresión óptima en una célula específica (tal como *S. cerevisiae*), la utilización de (el par de) codones del gen heterólogo puede optimizarse usando uno cualquiera de una variedad de paquetes de software de diseño de genes sintéticos, por ejemplo, GeneOptimizer® de Genent AG (Regensburg, Alemania) para la optimización de la utilización de codones o la optimización de la utilización de pares de codones tal como se describe en el documento PCT/EP2007/05594. Tal adaptación de la utilización de codones garantiza que los genes heterólogos, que son, por ejemplo, de origen bacteriano, se procesen eficazmente mediante la maquinaria de transcripción y traducción de la levadura. La optimización de la utilización del par de codones dará como resultado una expresión de proteínas potenciada en la célula de levadura. Las secuencias optimizadas pueden clonarse, por ejemplo, en un plásmido de expresión de levadura de alta copia, unido de manera operativa a un promotor (preferiblemente constitutivo) funcional en un hongo (levadura).

Tal como se indicó anteriormente, la invención se refiere además a la preparación de etanol.

Para un método de preparación de etanol, se usa una célula según la invención que en condiciones anaerobias fermenta un azúcar formando de ese modo etanol. Células de levadura adecuadas para fermentar el azúcar se conocen generalmente e incluyen, entre otras, *S. cerevisiae*. En un método de la invención, se usa una célula de levadura que también produce una acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.10). Esta célula puede obtenerse tal como se describió anteriormente y se ilustra en el ejemplo a continuación en el presente documento. Si se usa para la preparación de etanol, la célula también incluye una actividad acetil-coenzima A sintetasa. Si se usa para la preparación de etanol, la célula también incluye preferiblemente una actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. Estas actividades pueden estar presentes de manera natural, como en *S. cerevisiae*, o proporcionarse mediante modificación genética (véase también anteriormente en el presente documento).

Las condiciones de fermentación pueden basarse en principio en condiciones conocidas generalmente, por ejemplo, tal como se describe en la revisión de Van Maris citada anteriormente, o las referencias citadas en la misma, con la condición de que normalmente el medio en el que se lleva a cabo la fermentación comprenda acetato además del/de los carbohidrato(s) fermentable(s).

La razón molar de acetato con respecto a carbohidrato consumida por cultivos anaerobios de las células de levadura modificadas según la invención es habitualmente de al menos 0,004, en particular al menos 0,01, al menos 0,03, al menos 0,1 o al menos 0,2. La razón molar de acetato con respecto a carbohidrato presente en hidrolizados de biomasa lignocelulósica es habitualmente de menos de 0,70, en particular 0,5 o menos, más en particular 0,3 o menos, o 0,2 o menos. En el presente documento, el número de moles de carbohidrato se basa en unidades de monosacárido, es decir, un mol de un oligo/polisacárido que tiene n unidades de monosacárido cuenta como n moles.

En términos absolutos, la concentración de carbohidrato fermentable está habitualmente en el intervalo de 65 a 400 g/l, en particular en el intervalo de 100 a 250 g/l.

En términos absolutos, la concentración de acetato está habitualmente en el intervalo de 0,5 a 20 g/l, en particular en el intervalo de 1-15 g/l, más en particular en el intervalo de 2 a 12 g/l.

El pH puede elegirse dependiendo de lo que es aceptable para el organismo que se usa, basándose en el conocimiento general común o puede determinarse de manera rutinaria. Habitualmente la fermentación se lleva a cabo a un pH neutro o ácido, en particular a un pH en el intervalo de 2-7, más en particular a un pH de 3-6, incluso más en particular 3,5-5,5 (pH aparente medido en el medio de fermentación a la temperatura a la que tiene lugar la fermentación).

La temperatura puede elegirse dependiendo de lo que es aceptable para el organismo que se usa. Habitualmente la temperatura está en el intervalo de 15-50 grados C, en particular en el intervalo de 25-45 grados C.

Como carbohidrato fermentable en principio puede usarse cualquier carbohidrato que se metabolice mediante la célula recombinante específica, con etanol como producto metabólico. La célula puede comprender de manera natural el sistema de enzimas metabólicas requeridas o la célula puede haberse modificado genéticamente para ese propósito, por ejemplo, tal como se describe en la revisión de Van Maris, las referencias citadas en la misma, o tal como se describe en la presente divulgación. Preferiblemente, los carbohidratos fermentables en el hidrolizado comprenden al menos un carbohidrato seleccionado del grupo de hexosas, pentosas y oligosacáridos que comprenden una o más unidades de hexosa y/o pentosa. En particular, en el caso de que la célula recombinante sea del grupo *Saccharomyces*, preferiblemente *S. cerevisiae*, se usa al menos un carbohidrato seleccionado de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa, xilosa, arabinosa y manosa. Se han obtenido buenos resultados con glucosa.

Un método según la invención es adecuado en particular para preparar etanol usando un hidrolizado de al menos un polímero seleccionado de celulosa, hemicelulosa y pectina, preferiblemente al menos un polímero seleccionado de hemicelulosa y pectina, porque tras la hidrólisis de estos polímeros normalmente se libera acetato mediante hidrólisis o se forma como producto de descomposición. En particular, el hidrolizado puede ser material lignocelulósico hidrolizado, tal como biomasa lignocelulósica. Por ejemplo, el material lignocelulósico puede seleccionarse de material lignocelulósico agrícola, por ejemplo algodón, paja, hierba (elefante), bagazo, hojas y tronco de maíz, material lignocelulósico de plantas acuáticas, pulpa de remolacha azucarera, cortezas de cítricos, materiales lignocelulósicos de silvicultura, tal como materiales lignocelulósicos residuales de árboles o arbustos (material vegetal cortado/desramado/podado, serrín, etc.) o árboles o arbustos que se hacen crecer específicamente como fuente para materiales lignocelulósicos, por ejemplo, chopos, residuo (ligno)celulósico de la industria, por ejemplo, pulpa de madera, papel residual.

Preferiblemente, un hidrolizado lignocelulósico comprende uno o más azúcares fermentables (de manera notable glucosa, xilosa y arabinosa) y acetato, que se han formado durante la hidrólisis. Por tanto, en una realización preferida de la invención la preparación de etanol comprende una etapa en la que se hidroliza un material lignocelulósico, formando de ese modo un hidrolizado que comprende uno o más carbohidratos fermentables, en

particular glucosa y opcionalmente una o más de otras hexosas y pentosas, y acetato, hidrolizado que después se pone en contacto con una célula recombinante de la invención. Las concentraciones relativas de acetato y carbohidratos fermentables en el sustrato que se pone en contacto con la célula recombinante de la invención pueden modificarse optimizando las condiciones para hidrólisis, combinando diferentes hidrolizados y/o combinando con fuentes (parcialmente) refinadas de carbohidratos y/o ácido acético.

La metodología de hidrólisis adecuada puede basarse en la revisión de Van Maris citada anteriormente o las referencias citadas en la misma, e incluye hidrólisis enzimática, hidrólisis térmica, hidrólisis química y combinaciones de las mismas. Los polímeros se hidrolizan habitualmente en la medida de que al menos el 50%, preferiblemente al menos el 90%, en particular al menos el 95% de las cadenas se degraden en unidades de monosacárido o en unidades de monosacárido y unidades de disacárido.

La invención se ilustrará ahora mediante el siguiente ejemplo:

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Construcción y mantenimiento de cepas

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas (tabla 1) se originan de la familia CEN.PK, que se identificó previamente como referencia adecuada para estudios genéticos y fisiológicos combinados (van Dijken *et al.* (2000) *Enzyme Microb. Technol.* 26:706-714).

Tabla 1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas

Cepa	Genotipo relevante	Fuente/referencia
CEN.PK113-5D	<i>MATa ura3 GPD1 GPD2</i>	Colección de cepas EUROSCARF, Frankfurt, Alemania
IME076 (referencia)	<i>MATa ura3 GPD1 GPD2</i> p426_GPD(<i>URA3</i>)	
CEN.PK102-3A	<i>MATa ura3 leu2 GPD1 GPD2</i>	Colección de cepas EUROSCARF, Frankfurt, Alemania
RWB0094	<i>MATa ura3 leu2 gpd1(-</i> 1,1133)::loxP- <i>KanMX-loxP gpd2(-</i> 2,1281)::hphMX4	BIRD Engineering, Rotterdam
IMZ008	<i>MATa ura3 leu2 gpd1(-</i> 1,1133)::loxP <i>gpd2(-2,1281)::hphMX4</i> YEplac181(<i>LEU2</i>)	
IMZ132 (CBS125049)	<i>MATa ura3 leu2 gpd1(-</i> 1,1133)::loxP <i>gpd2(-2,1281)::hphMX4</i> YEplac181(<i>LEU2</i>) pUDE43(<i>URA3</i> pTHD3::mhpF (<i>E.coli</i>)):CYC1t)	Depositada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures el 16 de julio de 2009
IMZ127	<i>MATa ura3 leu2 gpd1(-</i> 1,1133)::loxP <i>gpd2Δ(-2,1281)::hphMX4</i> YEplac181(<i>LEU2</i>) p426_GPD(<i>URA3</i>)	

Para la disrupción del gen *GPD1* (*YDL022W*), puede amplificarse según PCR el casete de disrupción loxP-KanMX-loxP según Güldener *et al.* (1996, *Nucleic Acids Res.* 24:2519-2524), usando un conjunto de cebadores que contiene regiones flanqueantes de 45 nucleótidos homólogas a secuencias dentro del gen *GPD1* y homólogos de aproximadamente 20 nucleótidos a secuencias del módulo de disrupción de pUG6 (Güldener *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2519-2524) (figura 2, tabla 2). De manera similar, puede usarse plásmido pAG32 ((Goldstein y McCusker (1999) *Yeast* 15:1541-1553) como molde para amplificación por PCR del módulo de disrupción hphMX4. Para la construcción de un casete de disrupción de *GPD2* (*YOL059W*) puede usarse un conjunto de cebadores que contiene regiones flanqueantes de 45 nucleótidos homólogas a secuencias dentro del gen *GPD2* y secuencias de 20 ácidos nucleicos homólogas a secuencias del módulo de disrupción de pAG32 (tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos para la inactivación de los genes *GPD1* y *GPD2* y para la verificación de una disrupción correcta mediante PCR diagnóstica. Oligonucleótidos de disrupción génica; los nucleótidos homólogos a la secuencia o bien a la izquierda (lado 5') o a la derecha (lado 3') de los genes que deben deletionarse se indican en mayúsculas; las letras minúsculas indican nucleótidos homólogos a la secuencia de los casetes de disrupción.

5

Gen diana	<i>GPD1/YDL022W</i>	<i>GPD2/YOL059W</i>
Cebadores de disrupción génica	<p>fw</p> <p>5'TTG TACACCCCCCCCCCTCC ACAAACACAAATATGATAAT ATAAAcagctgaagcttcgtacgc [SEQ ID NO: 5]</p> <p>rv</p> <p>5'AATCTAATCTTCATGTAGAT CTAATCTTCAATCATGTCCG GCGcatagggcactagtggatctg [SEQ ID NO: 6]</p>	<p>fw</p> <p>5'TCAATTCTCTTTCCCTTTCC TTTTCCCTTCGCTCCCCTTCCCT TATC ccagctgaagcttcgtacgc [SEQ ID NO: 7]</p> <p>rv</p> <p>5'GTGTCTATTTCGTCATCGATG TCTAGCTCTTCAATCATCTCC GGTAGgcatagggcactagtggatc [SEQ ID NO: 8]</p>
Cebadores de verificación – específicos para el gen diana	<p>fw 5' <i>GPD1</i></p> <p>5' CCCACCCACACCAATAAC [SEQ ID NO: 9]</p> <p>rv 3' <i>GPD1</i></p> <p>5' CGGACGCCAGATGCTAGAAG [SEQ ID NO: 10]</p>	<p>fw 5' <i>GPD2</i></p> <p>5' GTTTCAGCAGCTCTTCTCTAC [SEQ ID NO: 11]</p> <p>rv 3' <i>GPD2</i></p> <p>5' CCAAATGCGACATGAGTCAC [SEQ ID NO: 12]</p>
Cebadores de verificación – específicos para el casete de disrupción	<p>fw KANB</p> <p>5' CGCACGTCAAGACTGTCAAG [SEQ ID NO: 13]</p> <p>rv KANA</p> <p>5' TCGTATGTGAATGCTGGTCCG [SEQ ID NO: 14]</p>	<p>Fw KANB</p> <p>5' CGCACGTCAAGACTGTCAAG [SEQ ID NO: 15]</p> <p>rv KANA</p> <p>5' TCGTATGTGAATGCTGGTCCG [SEQ ID NO: 16]</p>

10

15

20

25

La transformación de los casetes de disrupción *GPD1* y *GPD2* amplificados mediante PCR a la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK102-3A (tabla 1) puede realizarse según los protocolos descritos por Güldener *et al* (Nucleic Acids Res. (1996) 24:2519-2524), seguido de la selección de transformantes en medio complejo YPD (Burke *et al.* (2000) Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbour Press Plainview, NY) con 200 mg/l de G-418 para cepas transformadas con el casete de disrupción KanMX y 300 mg/l de higromicina B para cepas transformadas con el casete de disrupción hphMX4. La confirmación de la integración correcta del casete de disrupción del gen *GPD1* puede comprobarse mediante PCR de colonia, usando combinaciones de conjuntos de cebadores 5' *GPD1*\KANA y 3'*GPD1*\KANB (tabla 2). La inactivación correcta de *GPD2* puede verificarse de manera similar con conjuntos de cebadores 5' *GPD2*\KANA y 3'*GPD2*\KANB (tabla 2). La cepa RWB0094, que porta delecciones en los marcos de lectura abiertos de los genes *GPD1* y *GPD2* de la cepa CEN.PK102-3A (*MATa ura3 leu2*) sustituidos por el casete loxP-KanMX-loxP y el casete hphMX4, respectivamente, se adquirió de BIRD Engineering, Rotterdam, Países Bajos. El marcador KanMX de la cepa RWB0094 se eliminó mediante expresión de la Cre recombinasa (Güldener *et al* (1996) Nucleic Acids Res. 24:2519-2524) y su auxotrofia de leucina se complementó mediante transformación con el plásmido que porta LEU2 YEPlac181 (Gietz, R. D. y S. Akio. (1988) Gene 74:527-534.), produciendo la cepa IMZ008. La Figura 1 2 muestra esquemáticamente el procedimiento de disrupción génica, la sustitución del ORF de *GPD1* por *KanMX* y el ORF de *GPD2* por *hphMX4*. Las flechas indican cebadores oligonucleotídicos para la verificación mediante PCR de diagnóstico de la inactivación génica correcta.

La transformación de la cepa IMZ008 con el plásmido de expresión de *mhpF* que porta *URA3* pUDE43 (véase a continuación) produjo la cepa prototrófica, que expresa *mhpF*, IMZ132, la transformación con el vector "vacío" que porta *URA3* p426_GPD produjo la cepa IMZ127. Finalmente, la transformación de la cepa CEN.PK113-5D (*ura3*) con p426_GPD produjo la cepa de referencia *GPD1 GPD2* prototrófica IME076. Los cultivos transformados con casetes de delección se sembraron en placa sobre medio complejo YPD que contenía G418 (200 mg l⁻¹) o

higromicina (200 mg l⁻¹). La integración satisfactoria de los casetes de delección se confirmó mediante PCR de diagnóstico.

- 5 Se hicieron crecer cultivos madre de todas las cepas en matraces de agitación que contenían 100 ml de medio sintético (véase a continuación) con 20 g l⁻¹ de glucosa como fuente de carbono. Tras añadir el 30% (v/v) de glicerol, se almacenaron alícuotas de 1 ml de cultivos en fase estacionaria a -80°C.

Construcción de plásmido

- 10 El gen *mhpF* de *E. coli* (número de registro EMBL Y09555,7) se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico de la cepa JM109 de *E. coli* K12 usando pares de cebadores *mhpF*-FW (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGAGTAAGCGTAAAGTCGCCATTATCGG-3' [SEQ ID NO: 3]) y *mhpF*-RV (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTTCATGCCGCTTCTCCTGCCTTGC-3', [SEQ ID NO: 4]), que contenían las secuencias attB1 y attB2, respectivamente. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó usando Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polimerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) según las especificaciones del fabricante y en un Biometra TGradient Thermocycler (Biometra, Göttingen, Alemania) con los siguientes ajustes: 25 ciclos de 10 s de desnaturalización a 98°C y 30 s de renaturalización y extensión a 72°C. El producto de PCR de 1011 pb se clonó usando tecnología de clonación Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se usó plásmido pDONR221, usando la reacción BP, para crear el clon de entrada, designado como plásmido pUD64. A partir de este clon de entrada y el plásmido multicopia pAG426GPD-ccdB (Addgene, Cambridge, MA, EE. UU.) se construyó el plásmido de expresión de levadura pUDE43 empleando la reacción LR. Las transformaciones de productos de reacción de recombinación en la cepa JM109 de *E. coli* K12 competente se realizaron según el kit de transformación de *E. coli* Z-Competent™ (Zymoresearch Corporation, Orange, EE. UU.) y se sembraron en placa sobre medio LB que contenían o bien ampicilina (100 mg l⁻¹) o bien kanamicina (50 mg.l⁻¹). Las transformaciones de levadura se realizaron según Burke *et al.* (Methods in yeast genetics (2000.) Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview, NY.) Tras transformaciones con el plásmido de expresión de levadura, se sembraron en placa células sobre medios sintéticos. La inserción satisfactoria del plásmido multicopia pUDE43 se confirmó mediante PCR de diagnóstico usando los pares de cebadores para clonación.

30 Cultivo y medios

- Se realizó en cultivo en matraz de agitación a 30°C en un medio sintético (46). El pH del medio se ajustó a 6,0 con KOH 2 M antes de la esterilización. Se prepararon precultivos inoculando 100 ml de medio que contenía 20 g l⁻¹ de glucosa en un matraz de agitación de 500 ml con cultivo madre congelado (1 ml). Tras 24 h de incubación a 30°C en un incubador-agitador Innova® (200 rpm, New Brunswick Scientific, NJ, EE. UU.), se transfirieron los cultivos a biorreactores.

- Se llevaron a cabo fermentaciones por lotes anaeróbicas a 30°C en biorreactores de laboratorio de 2 litros (Applikon, Schiedam, Países Bajos) con un volumen de trabajo de 1 litro. Se usó medio sintético con 20 g l⁻¹ de glucosa (46) para todas las fermentaciones y se complementó con 100 µl l⁻¹ de antiespumante de silicona (Silcolapse 5020, Caldic Belgium, Bleustar Silicones) así como con los factores de crecimiento anaeróbico, ergosterol (0,01 g l⁻¹) y Tween 80 (0,42 g l⁻¹) disueltos en etanol. Esto dio como resultado etanol 11-13 mM en el medio. Cuando estaba indicado, se añadió ácido acético a una concentración de 2 g l⁻¹ y se reajustó el pH a 5,0 antes de la inoculación. Se mantuvo el pH del cultivo a 5,0 mediante la adición automática de KOH 2 M. Los cultivos se agitaron a 800 rpm y se burbujearon con 0,5 l min⁻¹ de nitrógeno (<10 ppm de oxígeno). Se monitorizó el oxígeno disuelto con un electrodo de oxígeno autoclavable (Applisens, Schiedam, Países Bajos). Para minimizar la difusión de oxígeno, se equiparon los biorreactores con tubos Norprene (Cole Palmer Instrument Company, Vernon Hills, EE. UU.). Todas las fermentaciones se llevaron a cabo al menos por duplicado.

50 Determinación del peso seco y de la densidad óptica del cultivo

- Se filtraron muestras de cultivo (10 ml) a intervalos de tiempo seleccionados a través de filtros de nitrocelulosa pesados previamente (tamaño de poro 0,45 µm; Gelman Laboratory, Ann Arbor, EE. UU.). Tras la retirada del medio se lavaron los filtros con agua desmineralizada y se secaron en un horno microondas (Bosch, Stuttgart, Alemania) durante 20 min a 350 W y se pesaron. Las determinaciones por duplicado variaron en menos del 1%. También se monitorizó el crecimiento del cultivo por medio de lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro Novaspec® II.

60 Análisis de gases

- Se enfrió el gas de escape en un condensador (2°C) y se secó con un secador Permapure de tipo MD-110-48P-4 (Permapure, Toms River, EE. UU.). Se determinaron las concentraciones de oxígeno y de dióxido de carbono con un analizador NGA 2000 (Rosemount Analytical, Orrville, EE. UU.). Se determinaron la tasa de flujo de gas de escape y las tasas de producción de dióxido de carbono tal como se describió previamente (3). Al calcular estas tasas específicas de la biomasa, se hizo una corrección para los cambios en volumen provocados por la retirada de muestras de cultivo.

Análisis de metabolitos

Se analizó el sobrenadante obtenido mediante la centrifugación de muestras de cultivo para determinar glucosa, ácido acético, ácido succínico, ácido láctico, glicerol y etanol por medio de análisis mediante HPLC en un Waters Alliance 2690 HPLC (Waters, Milford, EE. UU.) que contenía una columna Biorad HPX 87H (Biorad, Hercules, EE. UU.). La columna se eluyó a 60°C con 0,5 g l⁻¹ de H₂SO₄ a una tasa de flujo de 0,6 ml min⁻¹. La detección fue por medio de un detector de índice de refracción Waters 2410 y un detector UV Waters 2487. Las concentraciones de glicerol inicial y final se determinaron adicionalmente usando un kit de determinación enzimático (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania). Durante el cultivo en biorreactores que se burbujeaban con gas de nitrógeno, se pierde una fracción significativa del etanol a través del gas de escape. Para corregir esto, se analizó la cinética de evaporación de etanol en biorreactores que se hacían funcionar en condiciones idénticas a diferentes volúmenes de trabajo con medio sintético estéril. Las constantes de evaporación de etanol dependientes del volumen resultantes (para esta configuración igual a 0,0080 dividido entre el volumen en litros, expresada en h⁻¹) se usaron para corregir las mediciones de HPLC de concentraciones de etanol en sobrenadantes de cultivo, teniendo en cuenta los cambios en volumen que se provocaron mediante la toma de muestras.

Ensayos de actividad enzimática

Se prepararon extractores celulares para ensayos de actividad de acetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (acetilante) a partir de cultivos de crecimiento exponencial en lotes anaeróbicos tal como se describió previamente (Abbott *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 75:2320-2325). Se midió la actividad acetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (acetilante) a 30°C monitorizando la oxidación de NADH a 340 nm. La mezcla de reacción (volumen total 1 ml) contenía tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5), NADH 15 mM y extracto celular. La reacción se inició mediante la adición de acetil-coenzima A 0,5 mM. Para la determinación de la actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.8), se prepararon extractos celulares tal como se describió anteriormente excepto que el tampón fosfato se sustituyó por tampón trietanolamina (10 mM, pH 5) (5,19). Se sometieron a ensayo las actividades glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en extractores celulares a 30°C tal como se describió previamente (Blomberg y Adler (1989), J. Bacteriol. 171:1087-1092. Las tasas de reacción eran proporcionales a las cantidades de extracto celular añadido. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método Lowry (Lowry *et al* (1951) J. Biol. Chem. 193:265-275) usando albúmina sérica bovina como patrón.

Resultados

Crecimiento y formación de producto en cultivos en lotes anaeróbicos

Cuando se complementaron cultivos de la cepa de *S. cerevisiae* de referencia prototrófica IME076 (*GPD1 GPD2*) con 2,0 g l⁻¹ de ácido acético, la tasa de crecimiento específico (0,32 h⁻¹) era idéntica a la notificada para cultivos que se hicieron crecer en ausencia de ácido acético (0,34 h⁻¹), Kuyper *et al.* (2005) FEMS Yeast Res. 5:399-409. La adición de ácido acético condujo a una ligera disminución de rendimiento de biomasa y, por consiguiente, una disminución del rendimiento de glicerol sobre glucosa en relación con cultivos que se hicieron crecer en ausencia de ácido acético (figura 2, tabla 3).

Este efecto se ha atribuido a la mayor tasa de desasimilación de glucosa para homeostasis de pH intracelular debido a la difusión de ácido acético al interior de la célula, lo que a su vez da como resultado un menor rendimiento de biomasa sobre glucosa. En las mismas condiciones, una cepa *gpd1Δ gpd2Δ* isogénica, en la que se confirmó la ausencia de actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ en extractores celulares (tabla 2), era completamente incapaz de crecer anaeróbicamente (Figura 2), consistente con la noción de que la producción de glicerol por medio de *Gpd1* y *Gpd2* es esencial para la nueva oxidación de NADH en cultivos anaerobios de *S. cerevisiae*.

Tabla 3 Fisiología de la cepa de *S. cerevisiae* modificada mediante ingeniería IMZ132 y la cepa de referencia de vector vacío IME076 durante el cultivo en lotes anaeróbicos sobre medio sintético (pH 5) con mezclas de glucosa-acetato

Cepas de levadura	IME076	IMZ132
Genotipo relevante	<i>GPD1 GPD2</i>	<i>gpd1Δ gpd2Δ</i> + <i>mhpF</i>
Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (μmol mg de proteína ⁻¹ min ⁻¹)	0,034 ± 0,003	< 0,002
Acetaldehído deshidrogenasa (acetilante) (μmol mg de proteína ⁻¹ min ⁻¹)	< 0,002	0,020 ± 0,004
Tasa de crecimiento específico (h ⁻¹)	0,32 ± 0,01	0,14 ± 0,01

Cepas de levadura	IME076	IMZ132
Rendimiento de biomasa sobre glucosa (g g^{-1})	$0,083 \pm 0,000$	$0,082 \pm 0,009$
Rendimiento de biomasa sobre acetato (g g^{-1})	n.a.	$3,8 \pm 0,5$
Rendimiento de glicerol sobre glucosa (g g^{-1})	$0,073 \pm 0,007$	$< 0,002$
Rendimiento de etanol sobre glucosa (g g^{-1}) <i>No corregido para la evaporación</i>	$0,39 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,01$
Rendimiento de etanol sobre glucosa (g g^{-1}) <i>Corregido para la evaporación</i>	$0,41 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$

n.a., no aplicable.

La expresión del gen *mhpF* de *E. coli* en una cepa *gpd1Δ gpd2Δ*, dando como resultado tasas dependientes de acetil-CoA de reducción de NADH en extractores celulares de $0,020 \mu\text{mol min}^{-1}$ ($\text{mg de proteína}^{-1}$) (tabla 3), no permitió el crecimiento anaeróbico cuando la glucosa era la única fuente de carbono. Sin embargo, cuando el medio se complementó con $2,0 \text{ g l}^{-1}$ de ácido acético, se observó un crecimiento exponencial a una tasa de crecimiento específico de $0,14 \text{ h}^{-1}$. No se produjo formación de glicerol durante el cultivo (Figura 2, tabla 3). Las cantidades traza ($<1 \text{ mM}$) de glicerol presentes en los cultivos de cepas *gpd1Δ gpd2Δ* cepas se originaron de los cultivos de inoculación que se iniciaron a partir de reservas de glicerol congeladas. El etanol era el principal producto orgánico y las pequeñas cantidades de succinato y lactato producidas eran similares a las observadas en cultivos de la cepa de referencia que se hizo crecer en las mismas condiciones (datos no mostrados).

Se observa que las fermentaciones de IMZ132 (40 h) duraron más tiempo que la cepa de tipo silvestre (15 h) y los cultivos en lotes anaeróbicos se burbujearon con gas de nitrógeno. Por consiguiente, la fracción de etanol perdida a través de evaporación era superior para la cepa IMZ132. Tras la determinación de la cinética de evaporación del etanol en experimentos control estériles y la corrección de los rendimientos de etanol, se mostró un rendimiento de etanol aparente un 13% superior para la cepa modificada mediante ingeniería según la invención, usando la ruta lineal para la reducción dependiente de NADH de ácido acético a etanol (tabla 3).

20 Discusión

El presente estudio proporciona una prueba del principio de que, estequiométricamente, el papel del glicerol como sumidero redox para el crecimiento anaeróbico de *S. cerevisiae* puede sustituirse completamente por una ruta lineal para la reducción dependiente de NADH de acetato a etanol. Esto ofrece perspectivas interesantes para la producción de etanol a gran escala a partir de materias primas que contienen ácido acético, tal como hidrolizados lignocelulósicos.

Además de reducir el contenido en carbono orgánico de los medios gastados y aumentar el rendimiento de etanol, la reducción de ácido acético a etanol puede aliviar al menos parcialmente la inhibición por acetato del crecimiento y el metabolismo de levadura, que es especialmente problemático a pH bajo y durante el consumo de azúcares de pentosa mediante cepas de levadura modificadas mediante ingeniería.

EJEMPLO 2:

Este ejemplo se refiere a la producción fermentativa de etanol libre de glicerol mediante una cepa de *Saccharomyces cerevisiae gpd1Δ gpd2Δ* que expresa una versión optimizada para los codones (SEQ ID NO: 28) del gen *dmpF* de tipo silvestre de *Pseudomonas sp. CF600* (n.º GenBank: CAA43226) (Shingler *et al.* (1992) J. Bacteriol. 174:71 1-24).

Para este propósito, se usaron los mismos procedimientos y técnicas usados para la construcción y evaluación del rendimiento de la cepa IMZ132 (*gpd1Δ gpd2Δ mhpF*). Estos procedimientos y técnicas se describen en la sección Materiales y métodos del ejemplo 1. En este trabajo, la transformación de la cepa IMZ008 (*gpd1Δ gpd2Δura3Δ*) con el plásmido de expresión *dmpF* que porta *URA3 pUDE47* dio la cepa prototrófica, que expresa *dmpF*, IMZ130. Para la construcción del plásmido pUDE47, una copia optimizada para los codones del gen *dmpF* (número de registro EMBL X60835.1) de *Pseudomonas sp. CF600* se ligó en el plásmido p426_GPD. La optimización de codones para la expresión en *S. cerevisiae* y el ligado al plásmido p426_GPD se realizaron mediante BaseClear BV (Leiden, Países Bajos). La inserción satisfactoria del plásmido multicopia pUDE47 se confirmó usando PCR de colonia de diagnóstico usando los pares de cebadores *dmpF-FW* (CATTGATTGCGCCATACG) y *dmpF-RV* (CCGTAATATCGGAACAGAC).

Resultados

Crecimiento y formación de producto en cultivos en lotes anaeróbicos

La expresión del gen *dmpF* de *Pseudomonas sp. CF600* en una cepa de *S. cerevisiae gpd1Δ gpd2Δ* dio resultados similares a los obtenidos para la expresión del gen *mhpF* de *E. coli* en la misma cepa. En fermentaciones en lotes anaeróbicos, similar a la cepa IMZ132 (*gpd1Δ gpd2Δ mhpF*), la expresión funcional del gen *dmpF* junto con la complementación del medio con 2,0 g l⁻¹ de ácido acético, dio como resultado un crecimiento exponencial con una tasa de crecimiento específico de 0,11 h⁻¹ (Figura 1). La cepa IMZ130 (*gpd1Δ gpd2Δ dmpF*) tenía un tiempo de lote ligeramente más largo (55 h) que la cepa IMZ132 (40 h). Durante el cultivo, la concentración inicial de 20 g l⁻¹ de glucosa se consumió completamente, mientras que no se observó formación de glicerol. Al mismo tiempo, el acetato se consumió de una concentración inicial de 2,1 g l⁻¹ hasta una concentración final de 1,6 g l⁻¹. El etanol era el principal producto orgánico, presentando un rendimiento de etanol sobre glucosa de 0,48 g g⁻¹ (rendimiento corregido mediante la evaporación de etanol). Se produjeron pequeñas cantidades de succinato y lactato, similares a las observadas en cultivos de la cepa de referencia que se hizo crecer en las mismas condiciones.

La Figura 3 muestra el porcentaje de CO₂ volumétrico presente en el flujo de salida de una fermentación por lotes inoculada con la cepa IMZ130 (*gpd1Δ gpd2Δ dmpF*). El gráfico se presenta a escala logarítmica en el eje y con el fin de demostrar el crecimiento exponencial y calcular la tasa de crecimiento específico máxima.

La inserción de una copia optimizada para los codones sintética del gen *dmpF* de *Pseudomonas sp. CF600*, proporciona otro ejemplo de que es estequiométricamente posible sustituir la formación de glicerol como sumidero redox en el crecimiento anaeróbico de *S. cerevisiae* por una ruta metabólica lineal para la reducción dependiente de NADH de acetato a etanol. Además, este ejemplo muestra que la inserción de acetaldehído deshidrogenasa (acetilante) en una cepa de *S. cerevisiae gpd1Δ gpd2Δ* dio como resultado rendimientos de etanol superiores sobre glucosa, ninguna formación de glicerol de subproducto y el consumo del compuesto inhibidor de la fermentación acetato.

Secuencias

SEQ ID NO: 1

Acetaldehído deshidrogenasa del gen mhpF de E. coli, acilante

ATGAGTAAAGCGTAAAGTCGCCATTATCGGTTCTGGCAACATTGGTACCGATCTGATGATTAATAATTTTGGCGTACGGTACGATCTGGAGATGGCGGTGATGGTTGGCATTGATCCTCAGTCCGACGGTCTGGCGCGCGCCAGACGTATGGGCGTCGCCACCACCCATGAAGGGGTGATCGGACTGATGAACATGCCTGAATTTGTGTGATATCGACATTGTATTTGATGCGACCAGCGCCGGTGTCTCATGTGAAAAACGATGCCGCTTTACGCGAAGCGAAACCGGATATTCGCTTAATTGACCTGACGCGCTGCCATCGGCCCTTACTGCGTGCCTGCGGTTAACCTCGAGGCGAAACGTTCGATCAACTGAACGTCAACATGGTCACCTGCGGCGGCCAGGCCACCATTCCAATGGTGGCGGCAGTTTACGCGTGGCGCGTGTTCATTACGCCGAAATTTATCGCTTCTATCGCCAGTAAATCTGCCGGA CCTGGCACGCGTGCCAATATCGATGAATTTACGGAAACCACTTCCCGAGCCATTG AAGTGGTGGGCGGCGCGGCAAAAGGGAAGGCGATTATTTGTGCTTAACCCAGCA GAGCCACCTGTGATGATGCGTGACACGGTGTATGTATTGAGCGACGAAGCTTCA CAAGATGATATCGAAGCCTCAATCAATGAAATGGCTGAGGCGGTGCAGGCTTAC GTACCGGGTTATCGCCTGAAACAGCGCGTGCAGTTTGAAGTTATCCCGCAGGATA AACCGGTCAATTTACCGGGCGTGGGGCAATTTCTCCGGACTGAAAAACAGCGGTCT GGCTGGAAGTCAAGGCGCAGCGCATTATCTGCCTGCCTATGCGGGCAACCTCG ACATTTGACTTCCAGTGCCTGGCGACAGCGAAAAAATGGCCAGTCACTGG CGCGCAAGGCAGGAGAAGCGGCATGA

SEQ ID NO: 2

Acetaldehído deshidrogenasa de E. coli OS=Escherichia coli (cepa K12) GN=mhpF PE=1 SV=1

MSKRKVAIIGSGNIGTDLMIKILRHGQHLEMAVMVGIDPQSDGLARARRMGVATTH EGVIGLMNMPFADIDIVFDATSAGAHVKNDAAALREAKPDIRLIDLTPAAIGPYC VPVVNLEANVDQLNVNMVTCGGQATIPMVAAVSRVARVHYAEIIASIASKSAGPGT RANIDEFTETTSRAIEVVGGAAKGAIIIVLNPAEPPLMMRDTVYVLSDEASQDDIEA SINEMAEAVQAYVPGYRLKQRVQFEVIPQDKPVNLPVGVQFSGLKTAVWLEVEGA AHYLPAYAGNLDIMTSSALATAEKMAQSLARKAGEAA

SEQ ID NO: 3

Cebador *mhpF*-FW

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAGTAAGCGTAAAGTCGCCATTATCGG

SEQ ID NO: 4

Cebador *mhpF*-RV

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTTCATGCCGCTTCTCCTGCCTTGC

SEQ ID NO: 5 Cebador de interrupción génica fw *GPD1/YDL022W*

ES 2 706 653 T3

TTGTACACCCCCCCCCCTCCACAAACACAAATATTGATAATATAAAAcagctgaagcttcgta
cgc

SEQ ID NO: 6 Cebador de disrupción génica rv *GPD1/YDL022W*

AATCTAATCTTCATGTAGATCTAATTCCTTCAATCATGTCCGGCGgcataggccactagtg
atctg

5

SEQ ID NO: 7 Cebador de disrupción génica fw *GPD2/YOL059W*

TCAATTCCTTTCCCTTTCCCTTTCCCTTCGCTCCCCCTTCCTTATC
ccagctgaagcttcgtaag

SEQ ID NO: 8 Cebador de disrupción génica rv *GPD2/YOL059W*

GTGTCTATTTCGTCATCGATGTCTAGCTCTTCAATCATCTCCGGTAGgcataggccaactag
tggatc

10

SEQ ID NO: 9 Cebador de verificación fw *GPD1/YDL022W*

CCCACCCACACCACCAATAC

15

SEQ ID NO: 10 Cebador de verificación rv *GPD1/YDL022W*

CGGACGCCAGATGCTAGAAG

SEQ ID NO: 11 Cebador de verificación fw *GPD2/YOL059W*

GTTCAGCAGCTCTTCTCTAC

20

SEQ ID NO: 12 Cebador de verificación rv *GPD2/YOL059W*

CCAAATGCGACATGAGTCAC

SEQ ID NO: 13 Cebador de verificación específico del casete de disrupción fw *GPD1/YDL022W*

CGCACGTCAAGACTGTCAAG

25

SEQ ID NO: 14 Cebador de verificación específico del casete de disrupción rv *GPD1/YDL022W*

TCGTATGTGAATGCTGGTCG

30

SEQ ID NO: 15 Cebador de verificación específico del casete de disrupción fw *GPD2/YOL059W*

CGCACGTCAAGACTGTCAAG

SEQ ID NO: 16 Cebador de verificación específico del casete de disrupción rv *GPD2/YOL059W*

TCGTATGTGAATGCTGGTCG

35

SEQ ID NO: 17 Gen ACS 1 de *S. cerevisiae*

ATGTCGCCCTCTGCCGTACAATCATCAAAACTAGAAGAACAGTCAAGTAAAATTG
ACAAG

TTGAAAAGCAAAAATGTCCCAGTCTGCCGCCACTGCGCAGCAGAAGAAGGAACAT
GAGTAT

GAACATTTGACTTCGGTCAAGATCGTGCCACAACGGCCCATCTCAGATAGACTGC
AGCCC

GCAATTGCTACCCACTATTCTCCACACTTGGACGGGTTGCAGGACTATCAGCGCT
TGCAC

AAGGAGTCTATTGAAGACCCTGCTAAGTTCTTCGGTTCTAAAGCTACCCAATTTT
TAAAC

TGGTCTAAGCCATTTCGATAAGGTGTTTCATCCAGACCCTAAAACGGGCAGGCCCT
CCTTC

CAGAACAATGCATGGTTCCCTCAACGGCCAATTAACGCCTGTTACAACCTGTGTTG
ACAGA

CATGCCTTGAAGACTCCTAACAAGAAAGCCATTATTTTCGAAGGTGACGAGCCTG
GCCAA

ES 2 706 653 T3

GGCTATTCCATTACCTACAAGGAACTACTTGAAGAAGTTTGTCAAGTGGCACAAG
TGCTG
ACTTACTCTATGGGCGTTTCGCAAGGGCGATACTGTTGCCGTGTACATGCCTATGG
TCCCA
GAAGCAATCATAACCTTGTGGCCATTTCCCGTATCGGTGCCATTCACTCCGTAG
TCTTT
GCCGGGTTTTCTTCCAACCTCCTTGAGAGATCGTATCAACGATGGGGACTCTAAAG
TTGTC
ATCACTACAGATGAATCCAACAGAGGTGGTAAAGTCATTGAGACTAAAAGAATTG
TTGAT
GACGCGCTAAGAGAGACCCCAGGCGTGAGACACGTCTTGGTTTATAGAAAGACC
ACAAT
CCATCTGTTGCTTTCCATGCCCCAGAGATTTGGATTGGGCAACAGAAAAGAAGA
AATAC
AAGACCTACTATCCATGCACACCCGTTGATTCTGAGGATCCATTATTCTTGTGTA
TACG
TCTGGTCTACTGGTGCCCCAAGGGTGTTCACATTCTACCGCAGGTTACTTGC
TGGGA
GCTTTGTTGACCATGCGCTACACTTTTGACACTCACCAAGAAGACGTTTTCTTCA
CAGCT
GGAGACATTGGCTGGATTACAGGCCACACTTATGTGGTTTATGGTCCCTTACTAT
ATGGT
TGTGCCACTTTGGTCTTTGAAGGGACTCCTGCGTACCCAAATTACTCCCGTTATT
GGGAT
ATTATTGATGAACACAAAGTCACCCAATTTTATGTTGCGCCAACCTGCTTTGCGTTT
GTTG
AAAAGAGCTGGTGATTCCCTACATCGAAAATCATTCCCTTAAAATCTTTGCGTTGCTT
GGGT
TCGGTCGGTGAGCCAATTGCTGCTGAAGTTTGGGAGTGGTACTCTGAAAAAATAG
GTAAA
AATGAAATCCCATTTGTAGACACCTACTGGCAAACAGAATCTGGTTCGCATCTGG
TCACC
CCGCTGGCTGGTGGTGTACACCAATGAAACCGGGTCTGCCTCATTCCCCTTCT
TCGGT
ATTGATGCAGTTGTTCTTGACCCTAACACTGGTGAAGAACTTAACACCAGCCACG
CAGAG
GGTGTCTTGCCTCAAAGCTGCATGGCCATCATTGCAAGAACTATTTGGAAAA
ATCAT
GATAGGTATCTAGACACTTATTTGAACCCCTTACCCTGGCTACTATTTCACTGGTG
ATGGT
GCTGCAAAGGATAAGGATGGTTATATCTGGATTTTGGGTTCGTGTAGACGATGTGG
TGAAC
GTCTCTGGTCACCGTCTGTCTACCGCTGAAATTGAGGCTGCTATTATCGAAGATC
CAATT
GTGGCCGAGTGTGCTGTTGTCCGATTCAACGATGACTTGACTGGTCAAGCAGTTG
CTGCA
TTTGTGGTGTGAAAAACAAATCTAGTTGGTCCACCGCAACAGATGATGAATTAC
AAGAT
ATCAAGAAGCATTTGGTCTTTACTGTTAGAAAAGACATCGGGCCATTTGCCGCAC
CAAAA
TTGATCATTTTAGTGGATGACTTGCCCAAGACAAGATCCGGCAAAATTATGAGAC
GTATT
TTAAGAAAAATCCTAGCAGGAGAAAGTGACCAACTAGGCGACGTTTCTACATTGT
CAAAC
CCTGGCATTGTTAGACATCTAATTGATTTCGGTCAAGTTGTAA

SEQ ID NO: 18 Gen ACS 2 de *S. cerevisiae*

ES 2 706 653 T3

ATGACAATCAAGGAACATAAAGTAGTTTATGAAGCTCACAAACGTAAAGGCTCTTA
AGGCT
CCTCAACATTTTTACAACAGCCAACCCGGCAAGGGTTACGTTACTGATATGCAAC
ATTAT
CAAGAAATGTATCAACAATCTATCAATGAGCCAGAAAAATCTTTGATAAGATGG
CTAAG
GAATACTTGCAATTGGGATGCTCCATACACCAAAGTTCAATCTGGTTCATTGAACA
ATGGT
GATGTTGCATGGTTTTTGAACGGTAAATGAATGCATCATACAATTGTGTTGACA
GACAT
GCCTTTGCTAATCCCGACAAGCCAGCTTTGATCTATGAAGCTGATGACGAATCCG
ACAAC
AAAATCATCACATTTGGTGAATTACTCAGAAAAGTTTCCCAAATCGCTGGTGTCT
TAAAA
AGCTGGGGCGTTAAGAAAGGTGACACAGTGGCTATCTATTTGCCAATGATTCCAG
AAGCG
GTCATTGCTATGTTGGCTGTGGCTCGTATTGGTGTATTCACTCTGTTGTCTTTGC
TGGG
TTCTCCGCTGGTTCGTTGAAAGATCGTGTCTGTTGACGCTAATCTAAAGTGGTCA
TCACT
TGTGATGAAGGTAAAAGAGGTGGTAAGACCATCAACACTAAAAAAATGTTGACG
AAGGT
TTGAACGGAGTCGATTTGGTTTTCCCGTATCTTGGTTTTCCAAAGAACTGGTACTG
AAGGT
ATTCCAATGAAGGCCGGTAGAGATTACTGGTGGCATGAGGAGCCGCTAAGCAG
AGAACT
TACCTACCTCCTGTTTCATGTGACGCTGAAGATCCTCTATTTTTATTATACACTTC
CGGT
TCCACTGGTTCCTCAAAGGGTGTCTGTTCACTACAGGTGGTTATTTATTAGGTG
CCGCT
TTAACAACCTAGATACGTTTTTGTATATCACCCAGAAGATGTTCTCTTCACTGCCGG
TGAC
GTCCGGCTGGATCACGGGTACACCTATGCTCTATATGGTCCATTAACCTTGGGTA
CCGCC
TCAATAATTTTCGAATCCACTCCTGCCTACCCAGATTATGGTAGATATTGGAGAA
TTATC
CAACGTCACAAGGCTACCCATTTCTATGTGGCTCCAACCTGCTTTAAGATTAATCA
AACGT
GTAGGTGAAGCCGAAATTGCCAAATATGACACTTCTTCATTACGTGTCTTGGGTT
CCGTC
GGTGAACCAATCTCTCCAGACTTATGGGAATGGTATCATGAAAAAGTGGGTAACA
AAAAC
TGTGTCATTTGTGACACTATGTGGCAAACAGAGTCTGGTTCATTTAATTGCTC
CTTTG
GCAGGTGCTGTCCCAACAAAACCTGGTTCGCTACCGTGCCATTCTTTGGTATTA
ACGCT
TGTATCATTGACCCTGTTACAGGTGTGGAATTAGAAGGTAATGATGTGCAAGGTG
TCCTT
GCCGTTAAATCACCATGGCCATCAATGGCTAGATCTGTTTGAACCACCACGACC
GTTAC
ATGGATACTTACTTGAAACCTTATCCTGGTCACTATTTACAGGTGATGGTGTCTG
GTAGA
GATCATGATGGTTACTACTGGATCAGGGGTAGAGTTGACGACGTTGTAAATGTTT
CCGGT
CATAGATTATCCACATCAGAAATTGAAGCATCTATCTCAAATCACGAAAACGTCT
CGGAA
GCTGCTGTTGTCCGATATCCAGATGAATTGACCGGTCAAACCGTCTGTCATATG
TTTCC
CTAAAAGATGGTTATCTACAAAACAACGCTACTGAAGGTGATGCAGAACACATCA
CACA
GATAATTTACGTAGAGAATTGATCTTACAAGTTAGGGGTGAGATTGGTCTTTCCG
CCTCA
CCAAAACCATTTATTCTAGTTAGAGATCTACCAAGAACAAGGTCAGGAAAGATTA
TGAGA
AGAGTTCTAAGAAAGGTTGCTTCTAACGAAGCCGAACAGCTAGGTGACCTAACTA
CTTTG
GCCAACCCAGAAGTTGTACCTGCCATCATTTCTGCTGTAGAGAACCAATTTTTCT
CTCAA
AAAAAGAAATAA

ES 2 706 653 T3

ATGTCTATCCCAGAAACTCAAAAAGGTGTTATCTTCTACGAATCCCACGGTAAGT
TGGAA
TACAAAGATATCCAGTTCCAAAGCCAAAGGCCAACGAATTGTTGATCAACGTTA
AATAC
TCTGGTGTCTGTACACTGACTTGCACGCTTGGCACGGTGACTGGCCATTGCCAG
TTAAG
CTACCATTAGTCGGTGGTCACGAAGGTGCCGGTGTCTGTTGTGGCATGGGTGAA
AACGTT
AAGGGCTGGAAGATCGGTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAACGGTTCTTGT
ATGGCC
TGTGAATACTGTGAATTGGGTAACGAATCCAACCTGTCTCACGCTGACTTGTCTG
GTTAC
ACCCACGACGGTCTTTTCCAACAATACGCTACCGCTGACGCTGTTCAAGCCGCTC
ACATT
CCTCAAGGTACCGACTTGGCCCAAGTCGCCCCATCTTGTGTGCTGGTATCACCG
TCTAC
AAGGCTTTGAAGTCTGCTAACTTGATGGCCGGTCACTGGGTTGCTATCTCCGGTG
CTGCT
GGTGGTCTAGGTTCTTTGGCTGTTCAATACGCCAAGGCTATGGGTTACAGAGTCT
TGGGT
ATTGACGGTGGTGAAGGTAAGGAAGAATTATTCAGATCCATCGGTGGTGAAGTCT
TCATT
GACTTCACTAAGGAAAAGGACATTTGTCGGTGTCTTCTAAAGGCCACTGACGGTG
GTGCT
CACGGTGTCAACGTTTCCGTTTCCGAAGCCGCTATTGAAGCTTCTACCAGAT
ACGTT
AGAGCTAACGGTACCACCGTTTTGGTTCGGTATGCCAGCTGGTGCCAAGTGTGTT
CTGAT
GTCTTCAACCAAGTCGTCAAGTCCATCTCTATTGTTGGTTCTTACGTCGGTAACA
GAGCT
GACACCAGAGAAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCA
AGGTT
GTCGGCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCG
TTGGT
AGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAA

SEQ ID NO: 20 ADH2 de *S. cerevisiae*

ATGTCTATCCAGAAACTCAAAAAGCCATTATCTTCTACGAATCCAACGGCAAGT
TGGAG
CATAAGGATATCCAGTTCCAAAGCCAAAGCCCAACGAATTGTTAATCAACGTCA
AGTAC
TCTGGTGTCTGCCACACCGATTTGCACGCTTGGCATGGTGACTGGCCATTGCCAA
CTAAG
TTACCATTAGTTGGTGGTCACGAAGGTGCCGGTGTCTGTTGTGGCATGGGTGAA
AACGTT
AAGGGCTGGAAGATCGGTGACTACGCCGGTATCAAATGGTTGAACGGTTCTTGT
ATGGCC
TGTGAATACTGTGAATTGGGTAACGAATCCAACCTGTCTCACGCTGACTTGTCTG
GTTAC
ACCCACGACGGTCTTTTCCAAGAATACGCTACCGCTGACGCTGTTCAAGCCGCTC
ACATT
CCTCAAGGTACTGACTTGGCTGAAGTCGCGCCAATCTTGTGTGCTGGTATCACCG
TATAC
AAGGCTTTGAAGTCTGCCAACTTGAGAGCAGGCCACTGGGCGGCCATTTCTGGT
GCTGCT
GGTGGTCTAGGTTCTTTGGCTGTTCAATATGCTAAGGCGATGGGTTACAGAGTCT
TAGGT
ATTGATGGTGGTCCAGGAAAGGAAGAATTGTTTACCTCGCTCGGTGGTGAAGTAT
TCATC
GACTTACCAAAGAGAAGGACATTTGTTAGCGCAGTCGTTAAGGCTACCAACGGC
GGTGCC
CACGGTATCATCAATGTTTCCGTTTCCGAAGCCGCTATCGAAGCTTCTACCAGAT
ACTGT

ES 2 706 653 T3

AGGGCGAACGGTACTGTTGTCTTGGTTGGTTTGCCAGCCGGTGCAAAGTGCTCCT
CTGAT
GTCTTCAACCACGTTGTCAAGTCTATCTCCATTGTCGGCTCTTACGTGGGGAACA
GAGCT
GATACCAGAGAAGCCTTAGATTTCTTTGCCAGAGGCTAGTCAAGTCTCCAATAA
AGGTA
GTTGGCTTATCCAGTTTACCAGAAATTTACGAAAAGATGGAGAAGGGCCAAATTG
CTGGT
AGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAA

SEQ ID NO: 21 ADH3 de *S. cerevisiae*

ATGTTGAGAACGTCAACATTGTTTACCAGGCGTGTCCAACCAAGCCTATTTTCTA
GAAAC
ATTCTTAGATTGCAATCCACAGCTGCAATCCCTAAGACTCAAAAAGGTGTCACT
TTTAT
GAGAATAAGGGGAAGCTGCATTACAAAGATATCCCTGTCCCGAGCCTAAGCCA
AATGAA
ATTTTAATCAACGTTAAATATTTCTGGTGTATGTCACACCGATTTACATGCTTGGCA
CGGC
GATTGGCCATTACCTGTTAAACTACCATTAGTAGGTGGTCATGAAGGTGCTGGTG
TAGTT
GTCAAACTAGGTTCCAATGTCAAGGGCTGGAAAAGTCGGTGATTTAGCAGGTATCA
AATGG
CTGAACGGTTCTTGTATGACATGCGAATTCTGTGAATCAGGTCATGAATCAAATT
GTCCA
GATGCTGATTTATCTGGTTACACTCATGATGGTTCTTTCCAACAATTTGCGACCG
CTGAT
GCTATTCAAGCCGCCAAAATTTCAACAGGGTACCGACTTGGCCGAAGTAGCCCCAA
TATTA
TGTGCTGGTGTACTGTATATAAAGCACTAAAAGAGGCAGACTTGAAAGCTGGTG
ACTGG
GTTGCCATCTCTGGTGTGTCAGGTGGCTTGGGTTCTTGGCCGTTCAATATGCAA
CTGCG
ATGGGTTACAGAGTTCTAGGTATTGATGCAGGTGAGGAAAAGGAAAAACTTTTCA
AGAAA
TTGGGGGGTGAAGTATTCATCGACTTTACTAAAACAAAGAATATGGTTTCTGACA
TTCAA
GAAGCTACCAAAGGTGGCCCTCATGGTGTCAATTAACGTTTCCGTTTCTGAAGCCG
CTATT
TCTCTATCTACGGAATATGTTAGACCATGTGGTACCGTCGTTTTGGTTGGTTTGC
CCGCT
AACGCCTACGTTAAATCAGAGGTATTCTCTCATGTGGTGAAGTCCATCAATATCA
AGGGT
TCTTATGTTGGTAACAGAGCTGATACGAGAGAAGCCTTAGACTTCTTTAGCAGAG
GTTTG
ATCAAATCACCAATCAAAAATGTTGGATTATCTGAATTACCAAAGGTTTATGACTT
GATG
GAAAAGGGCAAGATTTTGGGTAGATACGTCGTAAGTACTAGTAAATAA

SEQ ID NO: 22 ADH4 de *S. cerevisiae*

ES 2 706 653 T3

ATGTCTTCCGTTACTGGGTTTTACATTCCACCAATCTCTTTCTTTGGTGAAGGTGC
TTTA
GAAGAAACCGCTGATTACATCAAAAAACAAGGATTACAAAAGGCTTTGATCGTTA
CTGAT
CCTGGTATTGCAGCTATTGGTCTCTCCGGTAGAGTCCAAAAGATGTTGGAAGAAC
GTGAC
TTAAACGTTGCTATCTATGACAAAACCAACCAACCCAAATATTGCCAATGTCA
CAGCT
GGTTTGAAGGTTTTGAAGGAACAAAACCTCTGAAATTGTTGTTTCCATTGGTGGTG
GTTCT
GCTCACGACAATGCTAAGGCCATTGCTTTATTGGCTACTAACGGTGGGGAAATCG
GAGAC
TATGAAGGTGTCAATCAATCTAAGAAGGCTGCTTTACCACTATTTGCCATCAACA
CTACT
GCTGGTACTGCTTCCGAAATGACCAGATTCACTATTATCTCTAATGAAGAAAAGA
AAATC
AAGATGGCTATCATTGACAACAACGTCCTCCAGCTGTTGCTGTCAACGATCCAT
CTACC
ATGTTTGGTTTTGCCACCTGCTTTGACTGCTGCTACTGGTCTAGATGCTTTGACTC
ACTGT
ATCGAAGCTTATGTTTCCACCGCCTCTAACCCAATCACCGATGCCGTGCTTTGA
AGGGT
ATTGATTTGATCAATGAAAGCTTAGTCGCTGCATACAAAGACGGTAAAGACAAGA
AGGCC
AGAAGTACATGTGTTACGCTGAATACTTGGCAGGTATGGCTTTCAACAATGCTT
CTCTA
GGTTATGTTTCATGCCCTTGCTCATCAACTTGGTGGTTTTCTACCACTTGCCTCATG
GTGTT
TGTAACGCTGTCTTGTGCTCATGTTCAAGAGGCCAACATGCAATGTCCAAAGG
CCAAG
AAGAGATTAGGTGAAATTGCTTTGCATTTTCGGTGCTTCTCAAGAAGATCCAGAAG
AAACC
ATCAAGGCTTTGCACGTTTTAAACAGAACCATGAACATTCCAAGAACTTGAAAAG
AATTA
GGTGTAAAACCGAAGATTTTGAATTTTGGCTGAACACGCCATGCATGATGCCT
GCCAT
TTGACTAACCCAGTTCAATTCACCAAAGAACAAGTGGTTGCCATTATCAAGAAAG
CCTAT
GAATATTAA

SEQ ID NO: 23 ADH5 de *S. cerevisiae*

ATGCCCTCGCAAGTCATTCCTGAAAAACAAAAGGCTATTGTCTTTTATGAGACAG
ATGGA

ES 2 706 653 T3

AAATTGGAATATAAAGACGTACAGTTCCGGAACCTAAGCCTAACGAAATTTTAG
TCCAC
GTAAATATTTCTGGTGTITGTCATAGTGACTTGCACGCGTGGCACGGTGATTGGC
CATT
CAATTGAAATTTCCATTAATCGGTGGTCACGAAGGTGCTGGTGTGTTGTTAAGT
TGGGA
TCTAACGTAAAGGGCTGGAAGTCCGGTGATTTTGCAGGTATAAAATGGTTGAATG
GACT
TGCATGTCCTGTGAATATTTGTGAAGTAGGTAATGAATCTCAATGTCCTTATTTGG
ATGGT
ACTGGCTTACACATGATGGTACTTTTCAAGAATACGCAACTGCCGATGCCGTT
AAGCT
GCCCATATTCACCAAACGTCAATCTTGCTGAAGTTGCCCAATCTTGTGTGCAG
GTATC
ACTGTTTATAAGGCGTTGAAAAGAGCCAATGTGATAACCAGGCCAATGGGTCACTA
TATCC
GGTGCATGCCGTGGCTTGGGTTCTCTGGCAATCCAATACGCCCTTGCTATGGGTT
ACAGG
GTCATTGGTATCGATGGTGGTAATGCCAAGCGAAAAGTTATTTGAACAATTAGGCG
GAGAA
ATATTCATCGATTTACGGAAGAAAAAGACATTGTTGGTGTATAATAAAGGCCA
CTAAT
GGCGGTTCTCATGGAGTTATTAATGTGTCTGTTTCTGAAGCAGCTATCGAGGCTT
CTACG
AGGTATTGTAGGCCCAATGGTACTGTCGTCCTGGTTGGTATGCCAGCTCATGCTT
ACTGC
AATCCGATGTTTTCAATCAAGTTGTAATAATCAATCTCCATCGTTGGATCTTGTGT
TGGA
AATAGAGCTGATACAAGGGAGGCTTTAGATTTCTTCGCCAGAGGTTTGATCAAAT
CTCCG
ATCCACTTAGCTGGCCTATCGGATGTTCTGAAATTTTTGCAAAGATGGAGAAGG
GTGAA
ATTGTTGGTAGATATGTTGTTGAGACTTCTAAATGA

SEQ ID NO 24: GPD1 de *S. cerevisiae*

ATGTCGCTGCTGCTGATAGATTAACCTAACCTCCGGCCACTTGAATGCTGGTA
GAAAG
AGAAGTTCCTCTTCTGTTTCTTTGAAGGCTGCCGAAAAGCCTTTCAAGGTTACTG
TGATT
GGATCTGGTAACTGGGGTACTACTATTGCCAAGGTGGTTGCCGAAAATTGTAAGG
GATAC
CCAGAAGTTTTCGCTCCAATAGTACAAATGTGGGTGTTTGAAGAAGAGATCAATG
GTGAA
AAATTGACTGAAATCATAAATACTAGACATCAAACGTGAAATACCTGCCTGGCA
TCACT
CTACCCGACAATTTGGTTGCTAATCCAGACTTGATTGATTCAAGGATGTGCG
ACATC

ES 2 706 653 T3

ATCGTTTTCAACATTCCACATCAATTTTTGCCCGTATCTGTAGCCAATTGAAAGG
TCAT
GTTGATTACACGTCAGAGCTATCTCCTGTCTAAAGGGTTTTGAAGTTGGTGCTA
AAGGT
GTCCAATTGCTATCCTCTTACATCACTGAGGAACTAGGTATTC AATGTGGTGCTC
TATCT
GGTGCTAACATTGCCACCGAAGTCGCTCAAGAACACTGGTCTGAAACAACAGTTG
CTTAC
CACATTCCAAAGGATTTT CAGAGGCGAGGGCAAGGACGTCGACCATAAGGTTCTA
AAGGCC
TTGTTCCACAGACCTTACTTCCACGTTAGTGT CATCGAAGATGTTGCTGGTATCT
CCATC
TGTGGTGCTTTGAAGAACGTTGTTGCCTTAGGTTGTGTTTCGTCGAAGGTCTAG
GCTGG
GGTAACAACGCTTCTGCTGCCATCCAAAGAGTCGGTTTGGGTGAGATCATCAGAT
TCGGT
CAAATGTTTTTCCAGAATCTAGAGAAGAAACATACTACCAAGAGTCTGCTGGTG
TTGCT
GATTTGATCACCACCTGCGCTGGTGGTAGAAAACGTCAAGGTTGCTAGGCTAATGG
CTACT
TCTGGTAAGGACGCCCTGGGAATGTGAAAAGGAGTTGTTGAATGGCCAATCCGCT
CAAGGT
TTAATTACCTGCAAAGAAGTTCACGAATGGTTGGAAACATGTGGCTCTGT CGAAG
ACTTC
CCATTATTTGAAGCCGTATACCAAATCGTTTACAACA ACTACCCAATGAAGAACC
TGCCG
GACATGATTGAAGAATTAGATCTACATGAAGATTAG

SEQ ID NO: 25: GPD2 de *S. cerevisiae*

ATGCTTGCTGTCAGAAGATTAACAAGATACACATTCTTAAGCGAACGCATCCGG
TGTTA
TATACTCGTCGTGCATATAAAATTTTTGCCTTCAAGATCTACTTTCCTAAGAAGATC
ATTA
TTACAAACACA AACTGCACTCAAAGATGACTGCTCATACTAATATCAAACAGCACA
AACAC
TGT CATGAGGACCATCCTATCAGAAGATCGGACTCTGCCGTGTCAATTGTACATT
TGAAA
CGTGCGCCCTTCAAGGTTACAGTGATTGGTTCTGGTAACTGGGGGACCACCATCG
CCAAA
GTCATTGCGGAAAACACAGAATTGCATTCCCATATCTTCGAGCCAGAGGTGAGAA
TGTGG
GTTTTTGATGAAAAGATCGGCGACGAAAATCTGACGGATATCATAAATACAAGAC
ACCAG
AACGTTAAATATCTACCCAATATTGACCTGCCCCATAATCTAGTGCCGATCCTG
ATCTT
TTACACTCCATCAAGGGTGCTGACATCCTTGTTTTCAACATCCCTCATCAATTTTT
ACCA

ES 2 706 653 T3

AACATAGTCAAACAATTGCAAGGCCACGTGGCCCCTCATGTAAGGGCCATCTCGT
GTCTA
AAAGGGTTTCGAGTTGGGCTCCAAGGGTGTGCAATTGCTATCCTCCTATGTTACTG
ATGAG
TTAGGAATCCAATGTGGCGCACTATCTGGTGCAAACCTGGCACCGGAAGTGGCC
AAGGAG
CATTGGTCCGAAACCACCGTGGCTTACCAACTACCAAAGGATTATCAAGGTGATG
GCAAG
GATGTAGATCATAAGATTTTGA AATTGCTGTTCCACAGACCTTACTTCCACGTCA
ATGTC
ATCGATGATGTTGCTGGTATATCCATTGCCGGTGCCTTGAAGAACGTGCTGGCAC
TTGCA
TGTGGTTTCGTAG AAGGTATGGGATGGGGTAACAATGCCTCCGCAGCCATTCAA
GGCTG
GGTTTAGGTGAAATATCAAGTTCGGTAGAATGTTTTTCCAGAATCCAAAGTCG
AGACC
TACTATCAAGAATCCGCTGGTGTTCAGATCTGATCACCACCTGCTCAGGCGGTA
GAAAC
GTCAAGGTTGCCACATACATGGCCAAGACCGGTAAGTCAGCCTTGAAGCAGAA
AAGGAA
TTGCTTAACGGTCAATCCGCCCAAGGATAATCACATGCAGAGAAGTTCACGAGT
GGCTA
CAAACATGTGAGTTGACCCAAGAATTC CATTATTCGAGGCAGTCTACCAGATAG
TCTAC
AACAACTCCGCATGGAAGACCTACCGGAGATGATTGAAGAGCTAGACATCGAT
GACGAA
TAG

SEQ ID NO 26: *GPP1* de *S. cerevisiae*

ATGCCCTTTGACCACAAAACCTTTATCTTTGAAAATCAACGCCGCTCTATTCGATGT
TGAC
GGTACCATCATCATCTCTCAACCAGCCATTGCTGCTTTCTGGAGAGATTTTCGGTA
AAGAC
AAGCCTTACTTCGATGCCGAACACGTTATTCACATCTCTCACGGTTGGAGAACTT
ACGAT
GCCATTGCCAAGTTCGCTCCAGACTTTGCTGATGAAGAATACGTTAACAAGCTAG
AAGGT
GAAATCCAGAAAAGTACGGTGAACACTCCATCGAAGTTCAGGTGCTGTCAAGT
TGTGT
AATGCTTTGAACGCCTTGCCAAAGGAAAAATGGGCTGTGCGCCACCTCTGGTACCC
GTGAC
ATGGCCAAGAAATGGTTCGACATTTTGAAGATCAAGAGACCAGAATACTTCATCA
CCGCC
AATGATGTCAAGCAAGGTAAGCCTCACCCAGAACCATACTTAAAGGGTAGAAACG
GTTTG
GGTTTCCAATTAATGAACAAGACCCATCCAAATCTAAGGTTGTTGTCTTTGAAG
ACGCA
CCAGCTGGTATTGCTGCTGGTAAGGCTGCTGGCTGTA A AATCGTTGGTATTGCTA
CCACT
TTCGATTTGGACTTCTTGAAGGAAAAGGGTTGTGACATCATTGTCAAGAACCACG
AATCT
ATCAGAGTCGGTGAATACAACGCTGAAACCGATGAAGTCGAATTGATCTTTGATG
ACTAC
TTATACGCTAAGGATGACTTGTGAAATGGTAA

SEQ ID NO 27: *GPP2* de *S. cerevisiae*

ATGGGATTGACTACTAAACCTCTATCTTTGAAAGTTAACGCCGCTTTGTTTCGACG
 TCGAC
 GGTACCATTATCATCTCTCAACCAGCCATTGCTGCATTCTGGAGGGATTTCCGGTA
 AGGAC
 AAACCTTATTTTCGATGCTGAACACGTTATCCAAGTCTCGCATGGTTGGAGAACGT
 TTGAT
 GCCATTGCTAAGTTCGCTCCAGACTTTGCCAATGAAGAGTATGTTAACAAATTAG
 AAGCT
 GAAATTCGGTCAAGTACGGTGAAAAATCCATTGAAGTCCAGGTGCAGTTAAGC
 TGTGC
 AACGCTTTGAAACGCTCTACCAAAGAGAAATGGGCTGTGGCAACTTCCGGTACCC
 GTGAT
 ATGGCACAAAAATGGTTCGAGCATCTGGGAATCAGGAGACCAAAGTACTTCATTA
 CCGCT
 AATGATGTCAAACAGGGTAAGCCTCATCCAGAACCATATCTGAAGGGCAGGAAT
 GGCTTA
 GGATATCCGATCAATGAGCAAGACCCTTCCAAATCTAAGGTAGTAGTATTTGAAG
 ACGCT
 CCAGCAGGTATTGCCGCCGGAAAAAGCCGCCGGTTGTAAGATCATTGGTATTGCC
 ACTACT
 TTCGACTTGGACTTCTAAAGGAAAAAGGCTGTGACATCATTGTCAAAAAACCAG
 AATCC
 ATCAGAGTTGGCGGCTACAATGCCGAAACAGACGAAGTTGAATTCATTTTTCGACG
 ACTAC
 TTATATGCTAAGGACGATCTGTTGAAATGGTAA

SEQ ID NO: 28 ORF de *dmpF* optimizado para codones sintéticos para *Saccharomyces cerevisiae*.
 Secuencia de referencia: *Pseudomonas sp.* CF600

5 Número de registro EMBL: X60835.1
 ATGAATCAGAACTGAAAGTAGCTATCATAGGTTCCGGTAATATCGGAAC
 AGACCTGATGATTAAGGTACTGCGTAATGCAAAGTACTTAGAAATGGGCG
 CGATGGTCCGATCGATGCAGCCTCTGATGGACTGGCCAGAGCTCAAAGA
 ATGGGCGTTACGACTACTTATGCAGGTGTAGAAGGGCTAATCAAGCTTCC
 TGAATTTGCAGACATAGATTTTCGTCTTCGATGCTACATCTGCATCAGCCC
 ACGTTCAGAACGAGGCTTTATTAAGACAAGCTAAACCTGGTATTAGATTG
 ATCGACCTTACCCCGGCGCAATCGGTCCTTACTGTGTCCCGTAGTTAA
 TCTCGAGGAACATTTGGGCAAGTTGAACGTTAACATGGTTACTTTCGCGGTG
 GCCAAGCTACTATTCCGATGGTTCGAGCTGTCTCACGTGTAGCCAAAGTC
 CATTATGCTGAGATTGTTGCTTCTATTTCAAGCAAGAGTGCCGGACCTGG
 AACCAGAGCCAATATAGATGAATTCAGTACGACAACCAGTAAAGCCATAG
 AAGTTATTGGTGGTGTCTGCAAAGGGTAAAGCTATAATTTATTAAGCCCA
 GCTGAACCACCATTGATTATGAGGGATACGGTGTATGTGCTTTCCGCGCG
 CGCTGATCAAGCCGCTGTTCGAGCTTCTGTGGCTGAAATGGTTCAAGCGG
 TTCAAGCATACTGCGCAGGCTATAGGTTAAAACAACAGGTTTCAGTTTTCG
 GTGATTTCCCGAGTCCGCGCCACTAAACATCCCGGTTTGGGGAGATTTCAG
 CGGGTTGAAAAAAGTGTGTTTCTAGAAAGTAGAAGGTGCTGCTCATTATT
 TGCCAGCATACTGAGGAACTTAGATATTATGACTTCCGCGAGCGTTAGCT
 ACAGCCGAACGTATGGCGCAATCAATGTTGAATGCATAG

10 SEQ ID NO: 29 ORF de *dmpF*
 MNQKLVAIIGSGNIGTDLMIKVLNRNAKYLEMGAMVGIIDAASDGLARAQR
 MGVTTTYAGVEGLIKLPEFADIDFVFDATSASAHVQNEALLRQAKPGIRL
 IDLTPAAIGPYCVPVNVLEEHLGKLVNMVTCGGQATIPMVAAVSRVAKV
 HYAEIVASISSKSAGPGRANIDEFTTETTSKAIEVIGGAAGKKAIIIMNP
 AEPPLIMRDTVYVLSAAADQAAVAASVAEMVQAVQAYVPGYRLKQVQVQFD
 VIPESAPLNIPGLGRFSGLKTSVFLEVEGAAHYLPAYAGNLDIMTSAALA
 TAERMAQSMLNA

SEQ ID NO: 30 Cebador *dmpF*-FW
 CATTGATTGCGCCATACG

15 SEQ ID NO: 31 Cebador *dmpF*-RV
 CCGGTAATATCGGAACAGAC

SEQ ID NO: 32 Secuencia de tipo silvestre del gen *dmpF* de *Pseudomonas sp.* CF600.
 Número de registro EMBL: X60835.1

ES 2 706 653 T3

ATGAACCAGAAACTCAAAGTCGCGATCATCGGTTTCGGGCAATATCGGCACCGAC
CTGATGATCAAGGTGCTGCGCAACGCCAAGTACCTGGAAATGGGCGCCATGGTC
GGCATCGACGCCGCCTCCGACGGCCTGGCCCGCGCCAGCGCATGGGCGTGACC
ACCACCTATGCCGGCGTCCAAGGGCTGATCAAGCTGCCCGAATTCGCCGACATC
GATTCGTCTTCGACGCCACCTCGGCCAGTGCCACGTGCAGAACGAGGCGGTG
CTGCGCCAGGCCAAACCTGGCATCCGCCTGATCGACCTGACCCCGGCGGCCATC
GGCCCGTACTGCGTGCCGGTGGTCAATCTGGAGGAGCACCTCGGCAAGCTCAAC
GTCAACATGGTTACCTGCGGCGGCCAGGCGACCATCCCGATGGTCGCCGCGGT
TCCCGTGTGGCCAAGGTCCATTACGCCGAGATCGTCCGCTCGATCAGCAGCAAG
TCGGCCGGACCCGGCACCCGCGCCAACATCGACGAGTTCACCGAGACCACCAGC
AAAGCCATCGAAGTGATCGGTGGTTCGGCCAAGGGCAAGGCGATCATCATCATG
AACCCGGCTGAGCCGCCGCTGATCATGCGCGACACCGTGTATGTGCTGTCCGCC
GCCGCCGATCAGGCCGCCGCTCGCGGCCCTCGGTGGCGGAAATGGTTCAGGCGGTG
CAGGCCTACGTGCCCGGCTATCGCCTGAAGCAGCAGGTGCAGTTCGACGTGATC
CCCAGTCCGCGCCGCTGAACATCCCCGGTCTCGGCCGGTTCAGCGGGTTGAAG
ACCTCGGTGTTCTCGAAGTCGAAGGCGCCGCCATTACCTGCCGGCCTACGCC
GGCAACCTCGACATCATGACCTCCGCCGCGCTGGCTACCGCCGAGCGTATGGCG
CAGTCGATGTTGAACGCCTGA

REIVINDICACIONES

- 1.- Célula de levadura recombinante, en particular una célula transgénica de levadura, comprendiendo la célula una o más secuencias recombinantes, en particular heterólogas, de ácido nucleico que codifican para una proteína que tiene actividad acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.10), careciendo dicha célula de la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH, o teniendo la célula una actividad enzimática reducida con respecto a la síntesis de glicerol dependiente de NADH en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, estando dicha célula libre de actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD o teniendo actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD reducida en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, y/o estando la célula o bien libre de actividad glicerol fosfato fosfatasa o bien teniendo actividad glicerol fosfato fosfatasa reducida en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, y que comprende una mutación genómica en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en GPD1, GPD2, GPP1 y GPP2, y comprendiendo la célula de levadura una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una proteína que tiene actividad acetil-coenzima A sintetasa (EC 6.2.1.1) y una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una proteína que tiene actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (EC 1.1.1.1).
- 2.- Célula según la reivindicación 1, comprendiendo la célula una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican para una proteína que tiene actividad acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ representada mediante SEQ ID NO: 2 o by SEQ ID: 29 o un homólogo funcional de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 29, teniendo dicho homólogo una identidad de secuencia de al menos el 60% con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 29.
- 3.- Célula según la reivindicación 2, comprendiendo al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha proteína una secuencia según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 32 o un homólogo funcional de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO: 32, teniendo dicho homólogo una identidad de secuencia de al menos el 60% con SEQ ID NO: 1.
- 4.- Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, pudiendo ser la mutación en al menos un gen seleccionado del grupo de GPD1, GPD2, GPP1 y GPP2 una mutación de desactivación, mutación de desactivación que puede ser una delección completa de al menos uno de dichos genes en comparación con el gen de levadura de tipo silvestre correspondiente de la célula.
- 5.- Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, estando la célula libre de genes que codifican para glicerol 3-fosfato deshidrogenasas dependientes de NAD⁺ (EC 1.1.1.8).
- 6.- Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo la célula una célula de levadura seleccionada de Saccharomycetaceae, en particular del grupo de *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*; *Kluyveromyces*, tal como *Kluyveromyces marxianus*; *Pichia*, tal como *Pichia stipitis* o *Pichia angusta*; *Zygosaccharomyces*, tal como *Zygosaccharomyces bailii*; y *Brettanomyces*, tal como *Brettanomyces intermedius*.
- 7.- Célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo la célula la cepa de *S. cerevisiae* depositada el 16 de julio de 2009 en el Centraal Bureau voor Schimmelcultures con el número de depósito CBS125049.
- 8.- Un método para preparar etanol a partir de acetato y un carbohidrato fermentable que comprende cultivar las células de levadura según la reivindicación 1 en condiciones anaerobias.
- 9.- Uso de una célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la preparación de etanol.
- 10.- Método para preparar etanol, que comprende preparar etanol a partir de acetato y a partir de un carbohidrato fermentable - en particular un carbohidrato seleccionado del grupo de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa - preparación que se lleva a cabo en condiciones anaerobias usando una célula de levadura, comprendiendo dicha célula una proteína que tiene actividad acetil-coenzima A sintetasa y una proteína que tiene actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (EC 1.1.1.1), siendo dicha célula preferiblemente una célula seleccionada del grupo de células que carecen de la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH y células que tienen una actividad enzimática reducida con respecto a la síntesis de glicerol dependiente de NADH en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, estando dicha célula libre de actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD o teniendo actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD reducida en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, y/o estando la célula o bien libre de actividad glicerol fosfato fosfatasa o bien teniendo una actividad glicerol fosfato fosfatasa reducida en comparación con una célula de levadura de tipo silvestre correspondiente, y comprendiendo una mutación genómica en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en GPD₁, GPD₂, GPP₁ y GPP₂.

ES 2 706 653 T3

- 11.- El método según la reivindicación 10, en el que dicho cultivo se lleva a cabo en un medio de fermentación que comprende el acetato y el carbohidrato en una razón molar de 0,7 o menos, en particular al menos de 0,004 a 0,5, más en particular de 0,05 a 0,3.
- 5 12.- El método según la reivindicación 11, en el que al menos parte del carbohidrato y al menos parte del acetato se han obtenido hidrolizando un polisacárido seleccionado del grupo de lignocelulosas, celulosas, hemicelulosas y pectinas.
- 10 13.- Método según la reivindicación 12, en el que se ha hidrolizado biomasa lignocelulósica obteniendo de ese modo el carbohidrato fermentable y acetato.

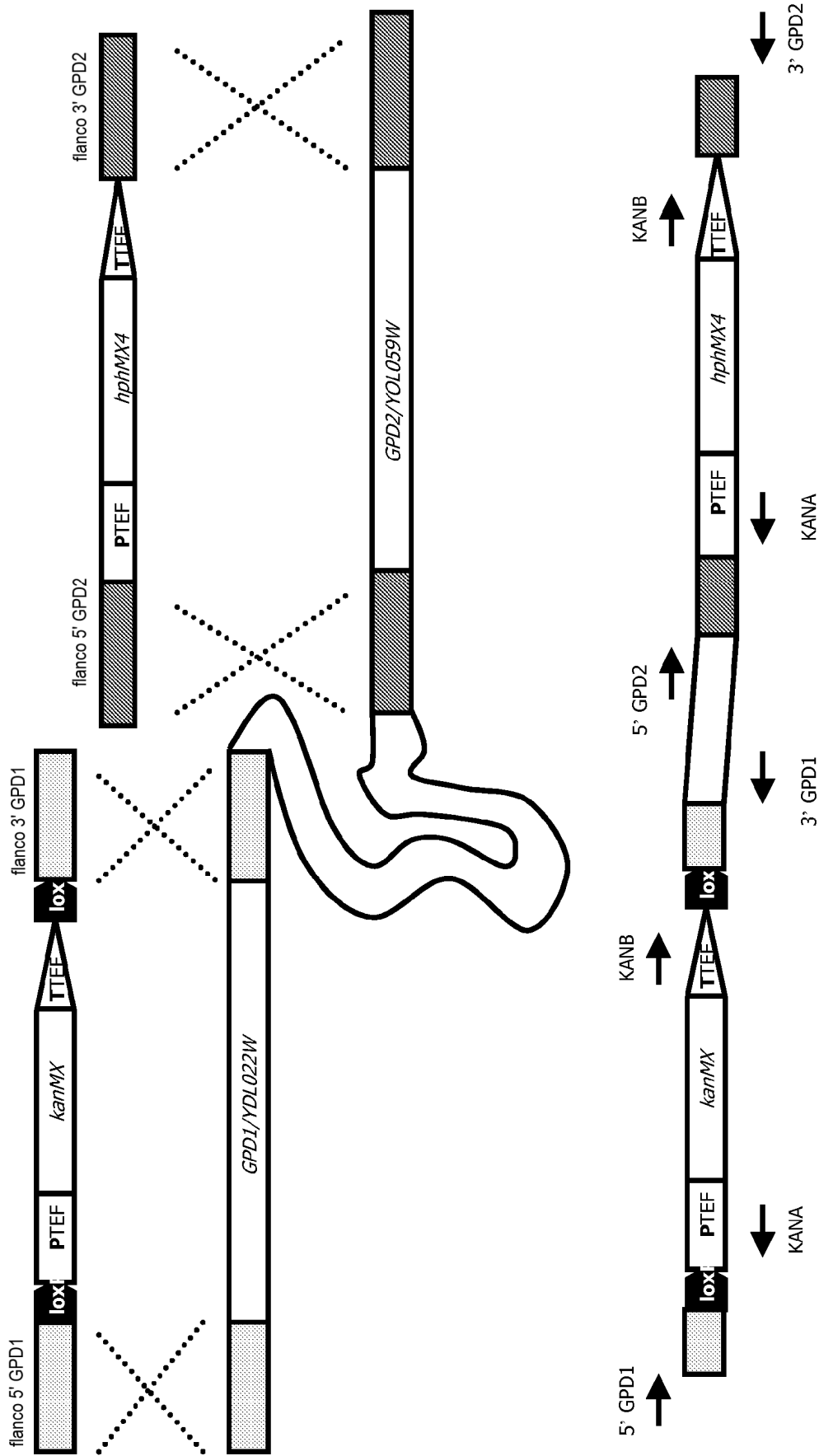


Fig. 1

Fig. 2

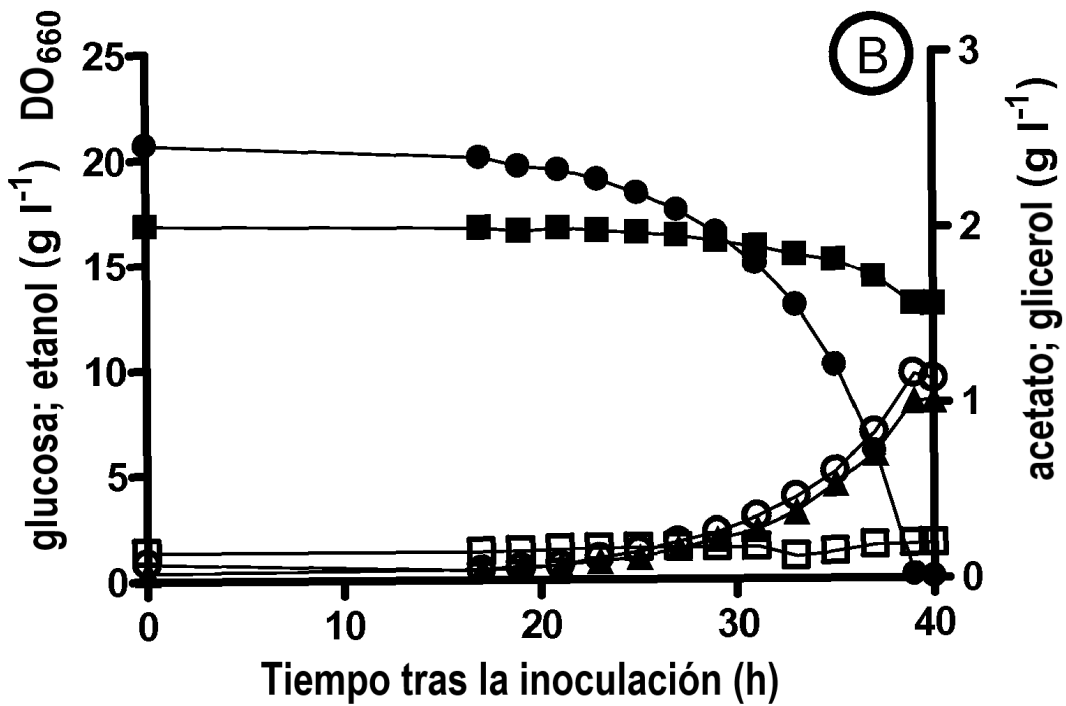
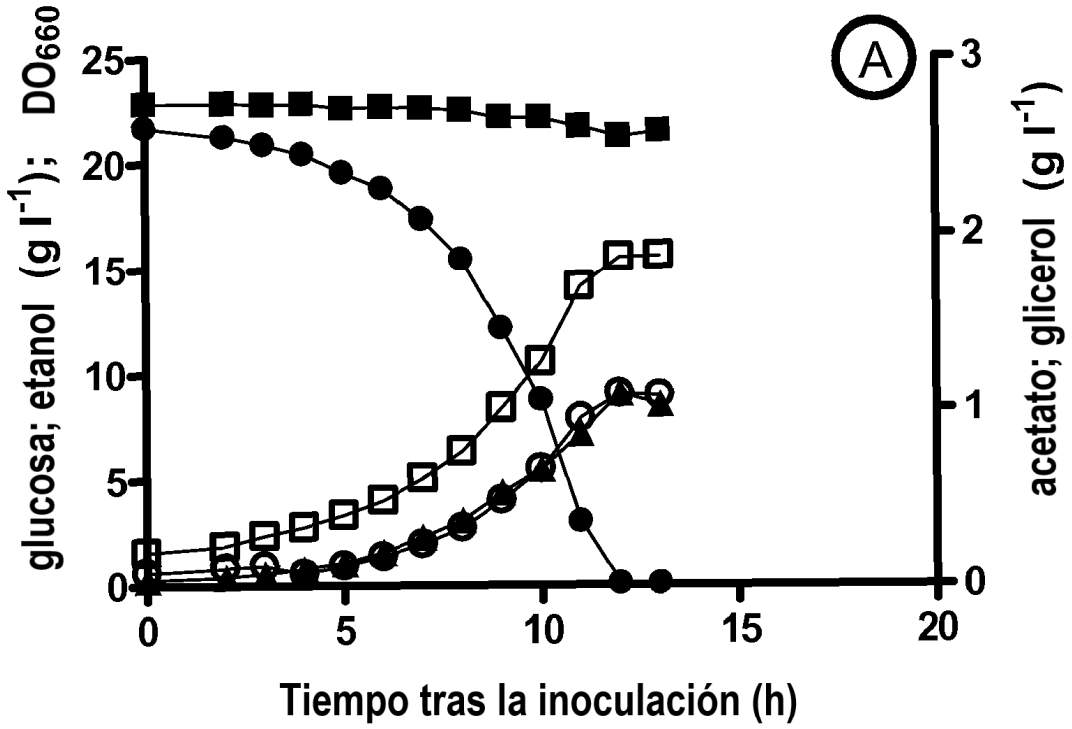
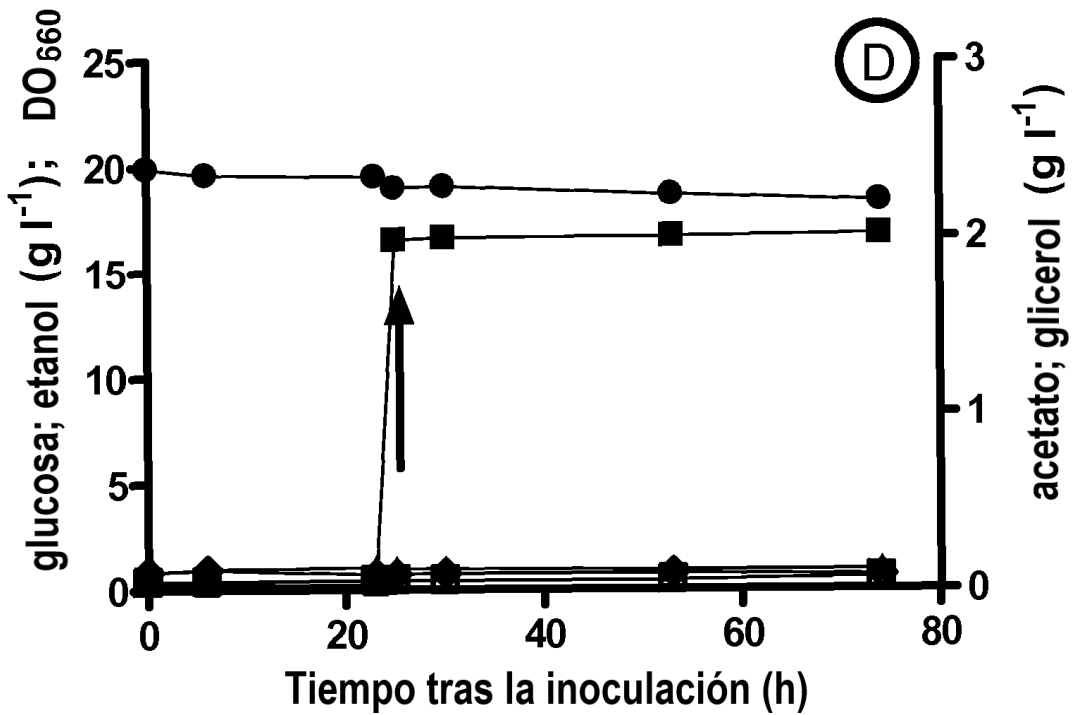
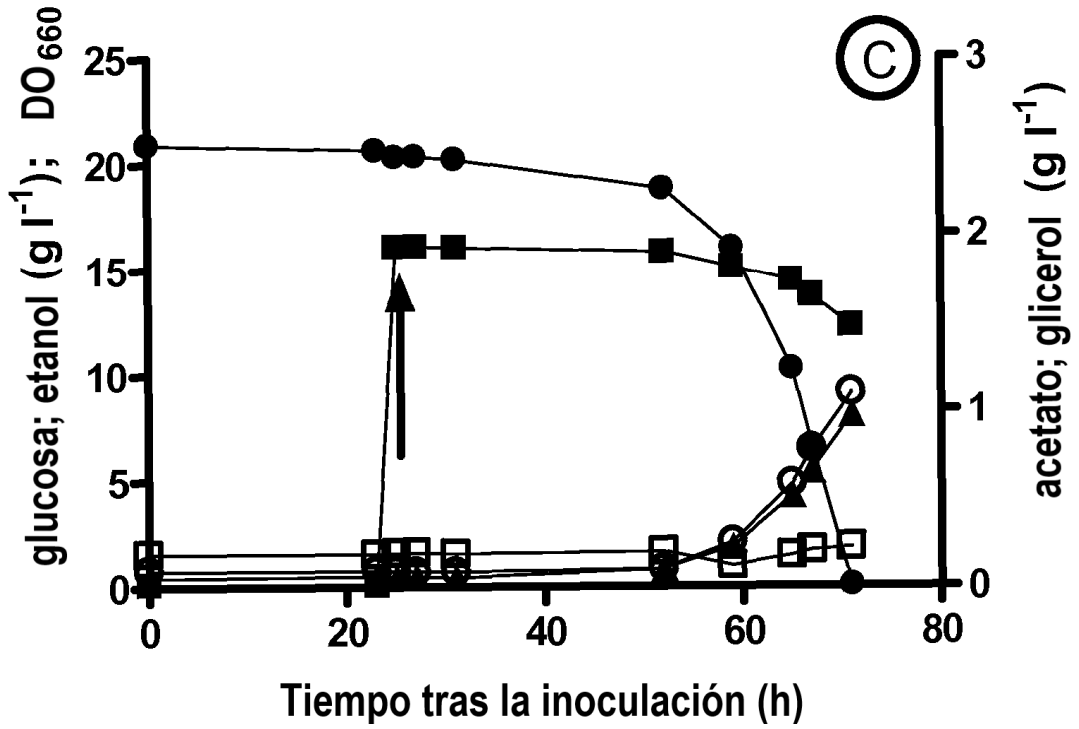


Fig. 2, cont.



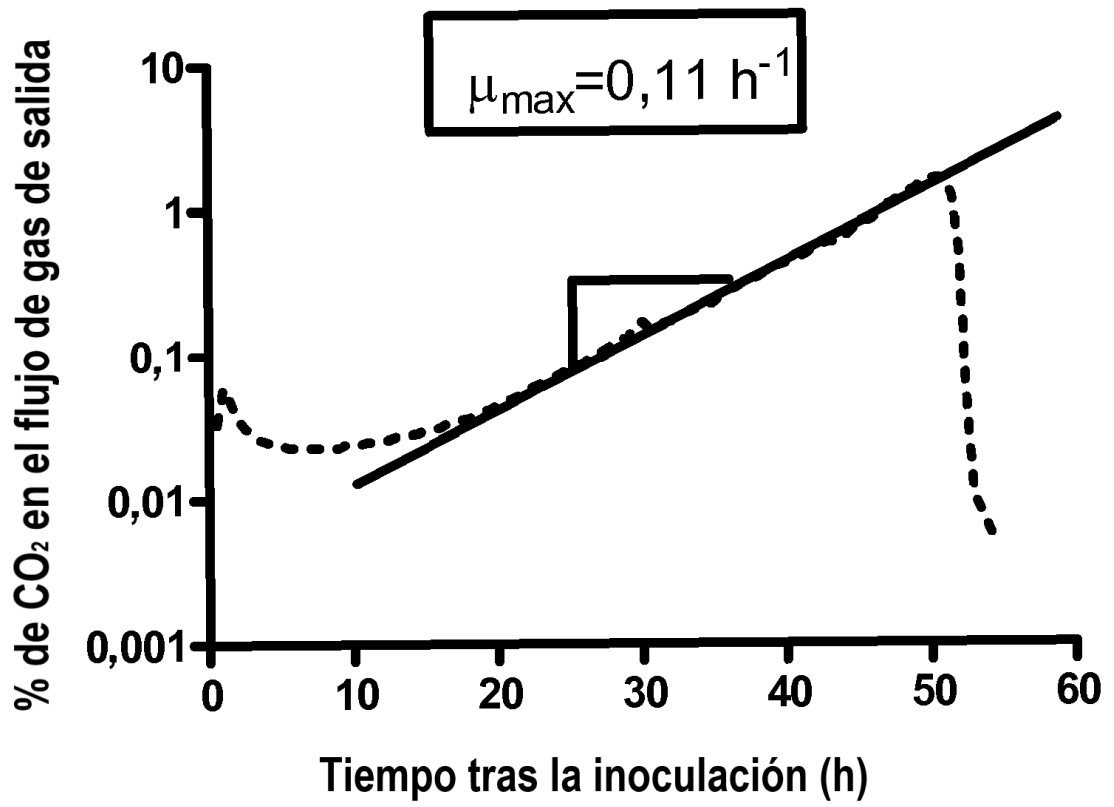


Fig. 3