

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 728**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2016 PCT/EP2016/073561**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17060195**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2016 E 16778760 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3359655**

54 Título: **Célula eucariota con elevada producción de producto de fermentación**

30 Prioridad:

06.10.2015 EP 15188645

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PAPAPETRIDIS, IOANNIS;
PRONK, JACOBUS, THOMAS;
VAN MARIS, ANTONIUS, JEROEN, ADRIAAN y
KLAASSEN, PAUL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 767 728 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

Célula eucariota con elevada producción de producto de fermentación

Campo

5 La presente invención se refiere a una célula eucariota con elevada producción de producto de fermentación. En particular, la invención se refiere a células eucariotas convertidoras de ácido acético, pentosa y glucosa con mejorada conversión de acetato. La invención se refiere además a los procesos en donde las células producen productos de fermentación tales como etanol.

Antecedentes

10 El bioetanol de segunda generación se produce a partir de, por ejemplo, fracciones lignocelulósicas de biomasa vegetal que se hidroliza en azúcares monoméricos libres, tales como hexosas y pentosas, para la fermentación en etanol. Aparte de la liberación de azúcar durante el pretratamiento y la hidrólisis de la biomasa, se forman algunos subproductos tóxicos. Por ejemplo, furfural y HMF son dos de estos productos. Las cantidades en las que se forman dependen de varios parámetros de pretratamiento, tales como temperatura, presión y tiempo de pretratamiento. Los hidrolizados lignocelulósicos también contienen altas cantidades de ácido acético, que es un potente inhibidor de la capacidad fermentativa de los microorganismos, tales como las células eucariotas.

15 Se ha informado de varios enfoques diferentes que podrían ayudar a reducir el efecto inhibidor de ácido acético sobre la fermentación de los azúcares en hidrolizados, así como a resolver (parcialmente) los problemas del equilibrio de oxidación-reducción tras la delección de los genes implicados en la producción de glicerol, por ejemplo, por ingeniería genética de células eucariotas. El ácido acético, junto con otros inhibidores, se pueden retirar de los hidrolizados mediante procedimientos de desintoxicación química o biológica. Las etapas de desintoxicación adicionales después del pretratamiento son, sin embargo, caras y/o provocan una pérdida de sustrato fermentable.

20 En condiciones anaerobias, *Saccharomyces cerevisiae* no puede consumir naturalmente ácido acético. Además, la tolerancia al ácido acético parece variar considerablemente entre diferentes cepas. La investigación anterior se ha centrado principalmente en la identificación de posibles candidatos a genes asociados a la elevada tolerancia y en la generación de cepas con elevada robustez mediante el uso de enfoques metabólicos/de ingeniería evolutiva. Sin embargo, no se ha explorado suficientemente el concepto de generación de cepas desintoxicantes mediante la expresión de enzimas heterólogas.

25 Medina et al. 2010 describen que la expresión de *mhpF* de *E. coli*, que codifica una acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺, permitió el crecimiento anaerobio de una cepa *gpd1Δ gpd2Δ* acoplado la reducción de acetato a acetaldehído con regeneración de NAD⁺. Este enfoque suprimió completamente la formación de glicerol y produjo un aumento de 13 % del rendimiento de etanol en azúcar, causado principalmente por la minimización de las pérdidas de carbono para la producción de glicerol y la reducción de ácido acético en etanol. Un beneficio adicional importante de esta estrategia es que permite la desintoxicación *in situ* de ácido acético por la levadura. Sin embargo, la cantidad de ácido acético que se puede reducir de esta forma está limitada por la cantidad de NADH que se genera durante el anabolismo, que se acopla a la formación de biomasa.

30 El documento de patente US 2005/153411 describe un método de preparación de una cepa productora de etanol, que utiliza xilosa, de *Saccharomyces cerevisiae* que comprende genes para la expresión en exceso de xilosa reductasa, xilitol deshidrogenasa y xilulocinasa, en donde además de dichos genes, se introducen y opcionalmente expresan en exceso los genes para la producción de fosfoacetiltransferasa y acetaldehído deshidrogenasa.

35 El documento de patente EP 2 277 989 describe una célula de levadura que carece de la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH o la célula que tiene una actividad enzimática reducida con respecto a la síntesis de glicerol dependiente de NADH en comparación con su célula de levadura no mutante correspondiente, comprendiendo la célula una o más secuencias de ácidos nucleicos heterólogas que codifican una actividad de acetaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.10) acetilante dependiente de NAD⁺.

40 El documento de patente WO2015/148272 describe una célula de levadura recombinante que incluye al menos un ácido nucleico heterólogo que codifica uno o más polipéptidos que tienen actividad de fosfoacetiltransferasa; actividad de fosfotransacetilasa; y/o actividad de acetaldehído deshidrogenasa acetilante, en donde la célula no incluye un gen de xilosa reductasa modificado heterólogo, y en donde la célula es capaz de elevada producción de productos finales bioquímicos en un proceso de fermentación cuando se compara con una célula de levadura parental.

45 Pickl et al. 2015 describen la purificación y caracterización de un novedoso tipo de Glc6PDH en *Haloferax volcanii*.

Por tanto, aún existe la necesidad de mejorar la conversión de acetato, pentosa y/o hexosa en producto de fermentación.

Sumario

- Es, por tanto, un objeto de la presente invención proporcionar células eucariotas que sean capaces de producir etanol a partir de ácido acético o acetato mientras que retienen sus capacidades de fermentación de hexosas (glucosa, fructosa, galactosa, etc.), así como pentosas como xilosa, así como procesos en donde estas cepas se usan para la producción de etanol y/u otros productos de fermentación.
- Es otro objeto proporcionar células, por ejemplo células eucariotas que son capaces de producir etanol a partir de glicerol y/o glicerol y ácido acético mientras que retienen sus capacidades de fermentación de hexosas (glucosa, fructosa, galactosa, etc.), así como pentosas como xilosa. Otro objeto es aumentar la producción de producto de fermentación (rendimiento, velocidad de producción, o ambos). En una realización de la misma, la célula eucariota produce menos glicerol.
- Además, es un objeto de la invención proporcionar una cepa de células eucariotas que pueda co-fermentar anaeróbicamente acetato, pentosa y glucosa.
- Es un objeto de la presente invención proporcionar un método rentable de producción de etanol por fermentación de pentosa y/o acetato.
- Es otro objeto de la presente invención proporcionar una célula eucariota que sea capaz de fermentar pentosa a una velocidad más alta que la que se puede lograr usando las cepas actualmente conocidos en la técnica.
- Es otro objeto reducir el tiempo de fermentación.
- Es otro objeto aumentar el rendimiento de la fermentación.
- Otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la revisión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.
- Se obtienen uno o más de estos objetos según la invención que proporciona una célula eucariota que está genéticamente modificada que comprende uno o más genes heterólogos que codifican:
- a) D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa;
 - b) 6-fosfogluconato deshidrogenasa y/o
 - c) glucosa deshidrogenasa, gluconolactonasa y gluconato cinasa,
- en donde a), b) y la glucosa deshidrogenasa en c) son dependientes de NAD⁺.
- Según la invención, se puede aumentar el nivel de NADH citosólico en la célula eucariota. Esto puede conducir en una realización a un rendimiento de glicerol mejorado, que es ventajoso en la industria vitivinícola. En una segunda realización, puede dar como resultado elevada reducción del nivel de acetato y/o elevado rendimiento de producto de fermentación, por ejemplo etanol, que es ventajoso en la industria de los biocombustibles. En una tercera realización, en particular cuando tanto a) y b) son dependientes de NAD⁺, la NADH generada se puede usar en la producción de cualquier producto de fermentación en la célula eucariota, en donde NADH en el citosol actúa de cofactor reductor. En una tercera realización, la NADH generada se puede usar en la producción de cualquier producto de fermentación en la célula eucariota, en donde la NADH en el citosol actúa de cofactor reductor. Estas ventajas se detallan a continuación en el presente documento.
- En una realización de la invención, la célula eucariota comprende un gen que codifica D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ a) (en esa realización la 6-fosfogluconato deshidrogenasa aún puede ser dependiente de NADP⁺). En otra realización de la invención, la célula eucariota comprende un gen que codifica 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (b) (en esa realización la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa aún puede ser dependiente de NADP⁺). En una realización, la célula eucariota comprende genes que codifican tanto (a) como (b), es decir, tanto D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (a) como 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (b). Las realizaciones a) y b) generan NADH citosólica. En una realización, la célula comprende c) glucosa deshidrogenasa, gluconolactonasa y gluconato cinasa. Estas tres enzimas forman otra vía de la glucosa a 6-fosfato-gluconato distinta de en la que participa (a) o (b), pero que también genera NADH, puesto que la glucosa deshidrogenasa en (c) es dependiente de NAD⁺. La realización (c) se puede combinar con las realizaciones (a) y/o (b).
- Así, en una realización, la célula eucariota tiene una alteración de uno o más genes nativos que codifican D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y/o genes nativos que codifican 6-fosfogluconato deshidrogenasa, en donde nativo es nativo en la célula eucariota.
- En una realización, la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa nativa en la célula eucariota se sustituye por la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ y/o la 6-fosfogluconato deshidrogenasa nativa en la célula eucariota se sustituye por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. De esa forma, el cofactor de

estas enzimas se modifica ventajosamente. Un cambio de la dependencia/especificidad de cofactor se puede denominar en el presente documento "ingeniería de cofactores".

Las células eucariotas según la invención, con gen(es) heterólogo(s) que codifica(n):

- 5 a) D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa;
 b) 6-fosfogluconato deshidrogenasa; y/o
 c) glucosa deshidrogenasa, gluconolactonasa y gluconato cinasa,

10 en donde a) y b) y glucosa deshidrogenasa en c) son dependientes de NAD⁺, produce más glicerol que la cepa nativa (que tiene tanto D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ como 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺). Las cepas producidas de esa forma son ventajosas para la aplicación en la industria vitivinícola, puesto que más glicerol puede mejorar el sabor del vino y al mismo tiempo se puede reducir la cantidad de etanol, que también se desea en la industria vitivinícola. Estas sorpresas se obtienen según la invención con efecto mínimo sobre la fermentación de la levadura del vino y el proceso de producción del vino. Alternativamente, las cepas según la invención se usan ventajosamente en la industria de los biocombustibles, por ejemplo la industria de los combustibles de bioetanol.

15 En una realización, la NADH generada se puede usar en la producción de cualquier producto de fermentación, en donde NADH en el citosol actúa de cofactor reductor. Esto permite la producción de productos de fermentación que de otro modo no se producirían por las células eucariotas debido a la ausencia de NADH en el citosol, o mejora el rendimiento en caso de que la producción de dicho producto de fermentación se limite por el nivel de NADH en el citosol. En esta realización es ventajoso que tanto (a) D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como (b) 6-fosfogluconato
 20 deshidrogenasa sean dependientes de NAD⁺, o incluso (a), (b) y (c1) glucosa deshidrogenasa sean dependientes de NAD⁺. Estas realizaciones permiten que los niveles de NADH en el citosol sean más altos. Así (a), (b) y (c1) crean flexibilidad: Es posible que el experto, para cada producto de fermentación y sustrato, convierta una parte flexible del sustrato en CO₂ y NADH en el citosol, que se adapta a la necesidad de producir el producto de fermentación con un alto rendimiento. En una realización, el producto de fermentación es un producto que está más reducido que el
 25 sustrato del que derivó, por ejemplo glucosa. Los ejemplos de productos de fermentación adecuados que están más reducidos que la glucosa es el glicerol. El experto puede determinar los productos de fermentación que pueden ser fermentados de esa forma. Dicha fermentación puede ser aerobia o anaerobia.

En una realización, la célula eucariota es genéticamente modificada, que comprende uno o más genes heterólogos que codifican:

- 30 a) D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y/o
 b) 6-fosfogluconato deshidrogenasa;

en donde a) y b) son dependientes de NAD⁺.

En una realización de la invención, en donde la célula eucariota comprende:

- 35 d) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ (E.C. 1.2.1.10) heteróloga;
 e) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una acetil-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.1) homóloga o heteróloga; y opcionalmente
 40 g) una modificación que conduce a la reducción de la actividad de glicerol-3-fosfato fosfohidrolasa (E.C. 3.1.3.21) y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.8 o E.C. 1.1.5.3), nativa en la célula eucariota, las ventajas de dichas cepas según la invención son elevado consumo de acetato y elevada producción de producto de fermentación, por ejemplo etanol.

45 Por tanto la invención se refiere además a un proceso para la fermentación de un sustrato para producir un producto de fermentación con la célula eucariota anterior, en donde se reduce el tiempo de fermentación y/o se aumenta el rendimiento, con elevada salida de producto de fermentación simultánea, con respecto a la fermentación correspondiente con célula eucariota no mutante (como se define en el presente documento).

Breve descripción de los dibujos

50 La FIG. 1 muestra actividades enzimáticas específicas *in vitro* de extractos libres de células de cultivos de crecimiento exponencial en matraz oscilante, recogidas a DO (la densidad óptica se mide en el presente documento a 660 nm, y se abrevia "DO") = 4 a 5. Se cultivaron los cultivos en medio sintético complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa, pH 6, 30 °C, 200 rpm. Se indican: se da la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ para cuatro cepas: IMX585 (barras blancas, izquierda),

IMX705 (barras gris claro), IMX706 (barras gris medio) y IMX707 (barras gris oscuro, derecha). Los datos de las barras de error de experimentos duplicados independientes significan desviaciones de los duplicados.

FIG. 2. Perfiles de fermentación de IMX585 (Fig. 2a, arriba), IMX705 (Fig. 2b, arriba), IMX899 (Fig. 2a, centro), IMX756 (Fig. 2b, centro). Glucosa = círculos rellenos, biomasa = cuadrados rellenos, glicerol = cuadrados abiertos, etanol = círculos abiertos. Las fermentaciones se realizaron en medio sintético complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa. Los lotes se realizaron a pH 5, burbujeo de 500 mL min⁻¹ de N₂, 30 °C. La biomasa se calculó convirtiendo los valores de DO a través de la fermentación hasta biomasa basándose en una fórmula entre DO y conversión de biomasa derivada de la representación de muestras de biomasa reales frente a DO durante la fase exponencial media.

Rendimiento de glicerol en glucosa de las fermentaciones de lotes anaerobios realizados con IMX585, IMX705, IMX899, IMX756 (Fig. 2a, abajo). Rendimientos de etanol en glucosa a partir de las mismas fermentaciones (Fig. 2b, abajo). El cálculo de los rendimientos de etanol se basó en datos corregidos para la evaporación. Los datos se presentan como promedios de experimentos duplicados independientes.

FIG. 3: Perfiles de fermentación de IMX585 (Fig. 3a, arriba), IMX888 (Fig. 3b, arriba) y IMX860 (Fig. 3a, centro). Glucosa = círculos rellenos, biomasa = cuadrados rellenos, glicerol = cuadrados abiertos, etanol = círculos abiertos, acetato = triángulos. Las fermentaciones se realizaron en medio sintético complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa y 3 g L⁻¹ de ácido acético. Los lotes se realizaron a pH 5, burbujeo de 500 mL min⁻¹ de N₂, 30 °C. La biomasa se calculó convirtiendo los valores de DO a través de la fermentación en biomasa basándose en una fórmula de conversión entre DO y biomasa basada derivada de la representación de muestras de biomasa reales frente a DO durante la fase exponencial media.

Relación entre el acetato consumido por la glucosa consumida en fermentaciones discontinuas anaerobias realizadas con IMX585, IMX888 y IMX860 (Fig. 3a, abajo). Relación de acetato consumido por biomasa formada a partir de las mismas fermentaciones (Fig. 3b, abajo). Los datos se presentan como promedios de experimentos duplicados independientes.

La FIG. 4 muestra el ciclo de tipo transhidrogenasa accionado por ATP catalizado por Acs1p/Acs2p, EutEp y Ald6p.

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 Casete de expresión sintético *gndA* de codones optimizados;

SEQ ID NO: 2 Proteína *GndA* (*Methylobacillus flagellates*);

SEQ ID NO: 3 Casete de expresión sintético *gox1705* de codones optimizados

SEQ ID NO: 4 Proteína *Gox1705* (*Gluconobacter oxidans 621H*)

SEQ ID NO: 5 Casete de expresión sintético de *6pgdh* de codones optimizados

SEQ ID NO: 6 Proteína *6pgdh* WP_011089498.1 (múltiples especies [*Bradyrhizobium*])

SEQ ID NO: 7 Gen *azf* de codones optimizados

SEQ ID NO: 8 Proteína *azf* (A00003728.1, *Haloferax volcanii*)

SEQ ID NO: 9 Casete de expresión *eutE*

SEQ ID NO: 10 Confirmación de cebador de delección de *GPD2* (Código de cebador: 2015)

SEQ ID NO: 11 Confirmación de cebador de delección de *GPD2* (Código de cebador: 2112)

SEQ ID NO: 12 Confirmación de cebador de delección de *GND1* (Código de cebador: 2123)

SEQ ID NO: 13 Confirmación de cebador de delección de *GND1* (Código de cebador: 2124)

SEQ ID NO: 14 Confirmación de cebador de delección de *ALD6* (Código de cebador: 2164)

SEQ ID NO: 15 Confirmación de cebador de delección de *ALD6* (Código de cebador: 2171)

SEQ ID NO: 16 Confirmación de cebador de delección de *GPD1* (Código de cebador: 4397)

SEQ ID NO: 17 Confirmación de cebador de delección de *GPD1* (Código de cebador: 4401)

SEQ ID NO: 18 Cebador para la amplificación del esqueleto de pMEL11 (Código de cebador: 5792)

ES 2 767 728 T3

- SEQ ID NO: 19 Cebador para la amplificación del esqueleto de pROS11 (Código de cebador: 5793)
- SEQ ID NO: 20 Cebador para la amplificación de la secuencia de inserción de pMEL11 (Código de cebador: 5979)
- SEQ ID NO: 21 Cebador para la amplificación del esqueleto de pMEL11 (Código de cebador: 5980)
- 5 SEQ ID NO: 22 Cebador para la amplificación de la secuencia de inserción de pROS11 (que se dirige a *GPD1*) (Código de cebador: 6965)
- SEQ ID NO: 23 Cebador para la amplificación de la secuencia de inserción de pROS11 (que se dirige a *GPD2*) (Código de cebador: 6966)
- 10 SEQ ID NO: 24 Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en *GPD1*) (Código de cebador: 6967)
- SEQ ID NO: 25 Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en *GPD1*) (Código de cebador: 6968)
- SEQ ID NO: 26 Cebador para la amplificación del inserto de pMEL11 (que se dirige a *GND2*) (Código de cebador: 7231)
- 15 SEQ ID NO: 27 Cebador para la confirmación de la delección de *GND2* (Código de cebador: 7258)
- SEQ ID NO: 28 Cebador para la confirmación de la delección de *GND2* (Código de cebador: 7259)
- SEQ ID NO: 29 Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en *GND2*) (Código de cebador: 7299)
- 20 SEQ ID NO: 30 Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en *GND2*) (Código de cebador: 7300)
- SEQ ID NO: 31 Cebador para la amplificación del inserto de pMEL11 (que se dirige a *GND1*) (Código de cebador: 7365)
- SEQ ID NO: 32 Cebador para la amplificación del casete de integración (*gndA*, *6pgdh*, *gox1705*) (Código de cebador: 7380)
- 25 SEQ ID NO: 33 Cebador para la amplificación del casete de integración (*gndA*, *6pgdh*, *gox1705*) (Código de cebador: 7381)
- SEQ ID NO: 34 Cebador para la confirmación de la integración de *gndA* (Código de cebador: 7441)
- SEQ ID NO: 35 Cebador para la confirmación de la integración de *gndA* (Código de cebador: 7442)
- SEQ ID NO: 36 Cebador para la confirmación de la integración de *6pgdh* (Código de cebador: 7443)
- 30 SEQ ID NO: 37 Cebador para la confirmación de la integración de *6pgdh* (Código de cebador: 7444)
- SEQ ID NO: 38 Cebador para la confirmación de la integración de *gox1705* (Código de cebador: 7445)
- SEQ ID NO: 39 Cebador para la confirmación de la integración de *gox1705* (Código de cebador: 7446)
- SEQ ID NO: 40 Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en *ALD6*) (Código de cebador: 7608)
- SEQ ID NO: 41 Oligonucleótido de reparación (inactivado en *ALD6*) (Código de cebador: 7609)
- 35 SEQ ID NO: 42 Cebador para la amplificación del inserto de pMEL11 (que se dirige a *ALD6*) (Código de cebador: 7610)
- SEQ ID NO: 43 Cebador para la amplificación del casete de integración (*eutE*) (Código de cebador: 7991)
- SEQ ID NO: 44 Cebador para la amplificación del casete de integración (*eutE*) (Código de cebador: 7992)
- SEQ ID NO: 45 Cebador para la confirmación de la integración de *eutE* (Código de cebador: 8337)
- 40 SEQ ID NO: 46 Cebador para la confirmación de la integración de *eutE* (Código de cebador: 8338)
- SEQ ID NO: 47 Secuencia de aminoácidos de aldehído oxidoreductasa (*EutE* de *Escherichia coli*);
- SEQ ID NO: 48 Secuencia de aminoácidos de glicerol deshidrogenasa de *E. coli* (*gldA* de *Escherichia coli*).

SEQ ID NO: 49 Secuencia de nucleótidos de *gndA* de codones optimizados (6-fosfogluconato deshidrogenasa) (*Methylobacillus flagellatus*)

SEQ ID NO: 50 Secuencia de nucleótidos de *gox1705* de codones optimizados (6-fosfogluconato deshidrogenasa) (*Gluconobacter oxidans*)

5 SEQ ID NO: 51 Secuencia de nucleótidos de *6pgdh* de codones optimizados (6-fosfogluconato deshidrogenasa) (*Bradyrhizobium sp.*)

SEQ ID NO: 52 Secuencia de nucleótidos de *azf* de codones optimizados (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) (*Haloferax volcanii*)

10 SEQ ID NO: 53 Secuencia de nucleótidos de *eutE* de codones optimizados (*acetaldehído deshidrogenasa acetilante*) (*E. coli*)

Descripción detallada

15 En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprenden" e "incluyen" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" se deben interpretar inclusivamente. Es decir, estas palabras pretenden expresar la posible inclusión de otros elementos o números enteros no específicamente citados, donde lo permita el contexto.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento. A modo de ejemplo, la célula puede ser en el presente documento una célula, pero también se refiere a una población de células o una cepa.

20 "Célula eucariota" se define en el presente documento como cualquier microorganismo eucariota. Los eucariotas pertenecen al taxón Eukarya o Eucariota. La característica definitoria que diferencia las células eucariotas de las células procariotas (Bacteria y Archaea) es que tienen orgánulos unidos a la membrana, especialmente el núcleo, que contiene el material genético, y está rodeado por la envoltura nuclear. La presencia de un núcleo da a los eucariotas su nombre, que procede del griego *εὖ* (*eu*, "bien") y *κάρυον* (*carion*, "nuez" o "fruto"). Las células eucariotas también contienen otros orgánulos unidos a la membrana, tales como mitocondrias y el aparato de Golgi. Muchos organismos unicelulares son eucariotas, tales como protozoos y hongos. Todos los organismos multicelulares son eucariotas. Los eucariotas unicelulares consisten en una única célula durante todo su ciclo vital. Los eucariotas microbianos pueden ser o haploides o diploides. Preferentemente, la célula eucariota es capaz de fermentación anaerobia, más preferentemente fermentación alcohólica anaerobia.

30 "Dependiente de NAD⁺" es en el presente documento una proteína específica de característica descrita por la fórmula:

$$1 < K_m\text{NADP}^+ / K_m\text{NAD}^+ < \infty \text{ (infinito)}$$

35 Dependiente de NAD⁺ es equivalente en el presente documento a específico de NAD⁺, la dependencia de NAD⁺ es en el presente documento equivalente a la especificidad por NAD⁺. En una realización, $K_m\text{NADP}^+ / K_m\text{NAD}^+$ es entre 1 y 1000, entre 1 y 500, entre 1 y 200, entre 1 y 100, entre 1 y 50, entre 1 y 10, entre 5 y 100, entre 5 y 50, entre 5 y 20 o entre 5 y 10.

40 La K_m es para las proteínas (por ejemplo, proteínas a, b) y c1) en las reivindicaciones) y se determina en el presente documento como específico de proteína, para NAD⁺ y NADP⁺ respectivamente, usando técnicas de análisis, cálculos y protocolos conocidos. Estos se describen en el presente documento y, por ejemplo, en Lodish et al., *Molecular Cell Biology* 6ª Edición, Ed. Freeman, páginas 80 y 81, por ejemplo la Figura 3-22.

"Identidad de secuencia"

45 Se dice que las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son homólogas cuando presentan un cierto nivel de similitud. Dos secuencias que son homólogas indican un origen evolutivo común. Si dos secuencias homólogas están estrechamente relacionadas o más distantemente relacionadas, se indica por "porcentaje de identidad" o "porcentaje de similitud", que es alto o bajo, respectivamente. Aunque se debate, para indicar "porcentaje de identidad" o "porcentaje similitud", se usan frecuentemente indistintamente "nivel de homología" o "porcentaje de homología". Una comparación de secuencias y determinación de porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden llevar a cabo usando un algoritmo matemático. El experto conocerá el hecho de que están disponibles varios programas informáticos diferentes para alinear dos secuencias y determinar la homología entre dos secuencias. Una visión general de la comparación de secuencias en D. Sankoff y J. B. Kruskal, (ed.), *Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison*, pp. 1-44 Addison Wesley). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch para el alineamiento de dos secuencias. (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). El algoritmo alinea secuencias de aminoácidos, así como secuencias de nucleótidos. El algoritmo de Needleman-

Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE. Con el fin de la presente invención, se usó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para secuencias de proteínas, se usa EBLOSUM62 para la matriz de sustitución.

5 Para secuencias de nucleótidos, se usa EDNAFULL. Se pueden especificar otras matrices. Los parámetros opcionales usados para el alineamiento de secuencias de aminoácidos son una penalización por abertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,5. El experto apreciará que todos estos parámetros diferentes darán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje global de identidad de dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan diferentes algoritmos.

10 *Definición de homología global*

La homología o identidad es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias completas con respecto a la región alineada total que incluye cualquier hueco o extensión. La homología o identidad entre las dos secuencias alineadas se calcula del siguiente modo: Número de posiciones correspondientes en el alineamiento que muestra un aminoácido idéntico en ambas secuencias dividido entre la longitud total del alineamiento que incluye los huecos. La identidad definida como en el presente documento se puede obtener de NEEDLE y se marca en la salida del programa como "IDENTIDAD".

15 *Definición de identidad más larga*

La homología o identidad entre las dos secuencias alineadas se calcula del siguiente modo: Número de posiciones correspondientes en el alineamiento que muestra un aminoácido idéntico en ambas secuencias dividido entre la longitud total del alineamiento después de la resta del número total de huecos en el alineamiento. La identidad definida como en el presente documento se puede obtener de NEEDLE usando la opción NOBRIEF y se marca en la salida del programa como "identidad más larga".

Una variante de una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos desvelada en el presente documento también se puede definir como una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que tiene una o varias sustituciones, inserciones y/o deleciones en comparación con la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos específicamente desvelada en el presente documento (por ejemplo, en el listado de secuencias).

Opcionalmente, en la determinación del grado de similitud de aminoácidos, el experto también puede tener en cuenta las denominadas sustituciones "conservativos" de aminoácidos, como será evidente para el experto. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Se desvelan variantes de sustitución de la secuencia de aminoácidos en el presente documento son aquellas en las que se ha retirado al menos un resto en las secuencias desveladas y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Preferentemente, el cambio de aminoácidos es conservativo. Las sustituciones conservativas preferidas para cada uno de los aminoácidos que existen de forma natural son las siguientes: Ala a ser; Arg a lys; Asn a gln o his; Asp a glu; Cys a ser o ala; Gln a asn; Glu a asp; Gly a pro; His a asn o gln; Ile a leu o val; Leu a ile o val; Lys a arg; gln o glu; Met a leu o ile; Phe a Met, leu o tyr; Ser a thr; Thr a ser; Trp a tyr; Tyr a trp o phe; y, Val a ile o leu.

También se pueden definir secuencias de nucleótidos de la invención por su capacidad para hibridarse con partes de las secuencias de nucleótidos específicas desveladas en el presente documento, respectivamente, en condiciones de hibridación moderadas, o preferentemente en rigurosas. Las condiciones de hibridación rigurosas se definen en el presente documento como condiciones que permiten que una secuencia de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente 25, preferentemente aproximadamente 50 nucleótidos, 75 o 100, y lo más preferentemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos, se hibride a una temperatura de aproximadamente 65 °C en una disolución que comprende sal aproximadamente 1 M, preferentemente 6 x SSC, o cualquier otra disolución que tiene una fuerza iónica comparable, y lavando a 65 °C en una disolución que comprende sal aproximadamente 0,1 M, o menos, preferentemente 0,2 x SSC, o cualquier otra disolución que tiene una fuerza iónica comparable. Preferentemente, la hibridación se realiza durante la noche, es decir, al menos durante 10 horas y el lavado se realiza preferentemente durante al menos una hora con al menos dos cambios de la disolución de lavado. Estas condiciones permitirán normalmente la hibridación de secuencias específicas que tienen aproximadamente 90 % o más identidad de secuencia.

Condiciones moderadas se definen en el presente documento como condiciones que permiten que una secuencia de ácidos nucleicos de al menos 50 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 200 o más nucleótidos, se hibride a una temperatura de aproximadamente 45 °C en una disolución que comprende sal aproximadamente 1 M,

preferentemente 6 x SSC o cualquier otra disolución que tiene una fuerza iónica comparable, y lavado a temperatura ambiente en una disolución que comprende sal aproximadamente 1 M, preferentemente 6 x SSC, o cualquier otra disolución que tiene una fuerza iónica comparable. Preferentemente, la hibridación se realiza durante la noche, es decir, al menos durante 10 horas, y preferentemente el lavado se realiza durante al menos una hora con al menos dos cambios de la disolución de lavado. Estas condiciones normalmente permitirán la hibridación específica de secuencias que tienen hasta 50 % de identidad de secuencia. El experto en la materia será capaz de modificar estas condiciones de hibridación con el fin de identificar específicamente secuencias que varían en identidad entre 50 % y 90 %.

Una "construcción de ácidos nucleicos" o "vector de ácido nucleico" se entiende en el presente documento que significa una molécula de ácidos nucleicos diseñada por el hombre resultante del uso de tecnología de ADN recombinante. El término "construcción de ácidos nucleicos", por tanto, no incluye moléculas de ácidos nucleicos que existen de forma natural, aunque una construcción de ácidos nucleicos puede comprender (partes de) moléculas de ácidos nucleicos que existen de forma natural. Los términos "vector de expresión" o "construcción de expresión" se refieren a secuencias de nucleótidos que son capaces de afectar la expresión de un gen en células hospedadoras u organismos hospedadores compatibles con tales secuencias. Estos vectores de expresión normalmente incluyen al menos secuencias reguladoras de la transcripción adecuadas y opcionalmente señales de terminación de la transcripción de 3'. También puede estar presentes factores necesarios adicionales o útiles en efectuar la expresión, tales como elementos potenciadores de la expresión. El vector de expresión se introducirá en una célula hospedadora adecuada y será capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante en un cultivo celular *in vitro* de la célula hospedadora. El vector de expresión será adecuado para la replicación en la célula hospedadora u organismo de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" o "secuencia reguladora de la transcripción" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona controlando la transcripción de una o más secuencias codificantes, y se localiza en la dirección 5' con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción de la secuencia codificante, y es estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, que incluye, pero no se limita a, sitios de unión al factor de transcripción, sitios de unión a la proteína represora y activadora, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida para un experto en la materia por actuar directamente o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es continuamente activo en la mayoría de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado desde el punto de vista fisiológico o del desarrollo, por ejemplo, por la aplicación de un inductor químico.

El término "marcador de selección" es un término familiar para un experto habitual en la materia y se usa en el presente documento para describir cualquier entidad genética que, cuando se expresa, se puede usar para seleccionar una célula o células que contienen el marcador de selección. El término "indicador" se puede usar indistintamente con marcador, aunque principalmente se usa para referirse a marcadores visibles, tales como proteína verde fluorescente (GFP). Los marcadores de selección pueden ser dominantes o recesivos o bidireccionales.

Como se usa en el presente documento, el término "operativamente unido" se refiere a un enlace de elementos de polinucleótido en una relación funcional. Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una secuencia reguladora de la transcripción está operativamente unida a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia codificante. Operativamente unido significa que las secuencias de ADN que se unen normalmente son contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en marco de lectura.

Los términos "proteína" o "polipéptido" se usan indistintamente y se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo específico de acción, tamaño, estructura tridimensional u origen.

Las levaduras se definen en el presente documento como microorganismos eucariotas e incluyen todas las especies de la subdivisión Eumycotina que crecen predominantemente en forma unicelular. Las levaduras pueden o bien crecer por gemación de un talo unicelular o bien crecer por fisión del organismo. Las células de levadura preferidas para su uso en la presente invención pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* y *Yarrowia*. Preferentemente, la levadura es capaz de fermentación anaerobia, más preferentemente fermentación alcohólica anaerobia.

"Hongos" (singular hongo) se entienden en el presente documento como microorganismos eucariotas heterotróficos que digieren su alimento externamente, absorbiendo moléculas nutrientes en sus células. Los hongos son un reino separado de organismos eucariotas e incluyen levaduras, mohos y setas. Los términos hongos, hongo y fúngico, como se usan en el presente documento, incluyen así expresamente levaduras, además de hongos filamentosos.

El término "gen" significa un fragmento de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) en una célula, operativamente unida a regiones reguladoras adecuadas (por ejemplo, un promotor). Un gen normalmente comprenderá varios fragmentos operativamente unidos,

tales como un promotor, una secuencia conductora de 5', una región codificante y una secuencia no traducida de 3' (extremo 3') que comprende un sitio de poliadenilación. "Expresión de un gen" se refiere al proceso en el que una región de ADN que está operativamente unida a regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe en un ARN, que es biológicamente activo, es decir, que es capaz de ser traducido en una proteína o péptido biológicamente activo.

El término "homólogo", cuando se usa para indicar la relación entre una molécula de ácido nucleico (recombinante) dada o de polipéptido y un organismo hospedador dado o célula hospedadora, se entiende que significa que en la naturaleza el ácido nucleico o molécula de polipéptido se produce por una célula hospedadora u organismos de la misma especie, preferentemente de la misma variedad o cepa. Si es homóloga a una célula hospedadora, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido normalmente se unirá operativamente (pero no necesariamente) a otra secuencia promotora (heteróloga) y, si es aplicable, otra secuencia señal secretora (heteróloga) y/o secuencia terminadora distinta de en su entorno natural. Se entiende que las secuencias reguladoras, secuencias señal, secuencias terminadoras, etc., también pueden ser homólogas a la célula hospedadora. En este contexto, el uso de solo elementos de secuencia "homólogos" permite la construcción de organismos genéticamente modificados (OGM) "auto-clonados" (la auto-clonación se define en el presente documento como en la Directiva europea 98/81/CE, Anexo II). Cuando se usa para indicar la vinculación de dos secuencias de ácidos nucleicos, el término "homólogo" significa que una secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria se puede hibridar con una secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria complementaria. El grado de hibridación puede depender de varios factores, que incluyen la cantidad de identidad entre las secuencias y las condiciones de hibridación, tales como la temperatura y concentración de sales como se trata después.

Los términos "heterólogo" y "exógeno", cuando se usan con respecto a un ácido nucleico (ADN o ARN) o proteína, se refieren a un ácido nucleico o proteína que no se produce naturalmente como parte del organismo, célula, genoma o secuencia de ADN o ARN en la que está presente, o que se encuentra en una célula o localización o localizaciones en el genoma o secuencia de ADN o ARN que se diferencian de aquella en la que se encuentra en la naturaleza. Los ácidos nucleicos heterólogos y exógenos o proteínas no son endógenos a la célula en la que se introducen, pero han sido obtenidos de otra célula o producidos sintéticamente o recombinantemente. En una realización, un gen heterólogo puede sustituir un gen homólogo, en particular un gen homólogo correspondiente (enzima de expresión con la misma función, pero en el presente documento con un cofactor diferente, es decir, dependiente de NAD⁺). Alternativamente, el gen homólogo se puede modificar en la célula para llegar a ser dependiente de NAD⁺, por ejemplo por una o más mutaciones puntuales en el genoma, por ejemplo con tecnología CRISPR CAS. En general, aunque no necesariamente, tales ácidos nucleicos codifican proteínas, es decir, proteínas exógenas, que normalmente no son producidas por la célula en la que el ADN se transcribe o expresa. Similarmente, el ARN exógeno codifica proteínas que normalmente no se expresan en la célula en la que está presente el ARN exógeno. Los ácidos nucleicos heterólogos/exógenos y proteínas también se pueden denominar ácidos nucleicos o proteínas extraños. Cualquier ácido nucleico o proteína que un experto en la materia reconocería como extraño a la célula en la que se expresa está englobado en el presente documento por el término ácido nucleico heterólogo o exógeno o proteína. Los términos heterólogo y exógeno también se aplican a combinaciones no naturales de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, es decir, combinaciones donde al menos dos de las secuencias combinadas son extrañas la una con respecto a la otra.

Se entiende en el presente documento que la "actividad específica" de una enzima significa la cantidad de actividad de una enzima particular por la cantidad de proteína de célula hospedadora total, normalmente expresada en unidades de actividad enzimática por mg de proteína de célula hospedadora total. En el contexto de la presente invención, la actividad específica de una enzima particular puede aumentar o disminuir en comparación con la actividad específica de esa enzima en una célula hospedadora no mutada (por lo demás idéntica).

"Condiciones anaerobias" o un proceso de fermentación anaerobia se define en el presente documento como condiciones o un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que sustancialmente no se consume oxígeno, preferentemente menos de 5, 2,5 o 1 mmol/L/h, más preferentemente se consumen 0 mmol/L/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable), y en el que las moléculas orgánicas sirven de tanto donante de electrones como aceptores de electrones.

"Alteración" se entiende en el presente documento que significa cualquier alteración de la actividad, e incluye, pero no se limita a, delección, mutación, reducción de la afinidad del gen alterado y expresión de ARN antisentido complementario a ARNm correspondiente. Nativo en célula eucariota en el presente documento se entiende como que el gen está presente en la célula eucariota antes de la alteración. Incluye la situación en la que el gen nativo en célula eucariota está presente en una célula eucariota no mutante, una célula eucariota de laboratorio o una célula eucariota industrial. La célula eucariota también se puede designar en el presente documento cepa de célula eucariota o parte de la cepa de célula eucariota.

Por célula eucariota "no mutante" se indica una cepa de células eucariotas fermentadoras de pentosa con niveles normales de genes funcionales dependientes de NADP⁺ de los que se obtiene la célula eucariota de la presente invención. En ciertos casos, la "célula eucariota no mutante", como se define en la presente solicitud de patente, puede incluir célula eucariota mutagenizada.

Las ecuaciones de reacción en el presente documento son no estequiométricas.

Se describen ahora ciertas realizaciones de la invención:

5 En una realización, la célula eucariota tiene una alteración de uno o más genes nativos que codifican D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y/o genes nativos que codifican 6-fosfogluconato deshidrogenasa, en donde nativo es nativo en la célula eucariota. En una realización, en la célula eucariota, la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa nativa en la célula eucariota se sustituye por la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa heteróloga y/o en donde la 6-fosfogluconato deshidrogenasa nativa en la célula eucariota se sustituye por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa heteróloga. En una realización, en la célula eucariota, los genes nativos que son parte de la vía de la pentosa-fosfato que son dependientes de NADP⁺ se alteran o delecionan. Los ejemplos de genes a alterar o delecionar son *GND1*, *GND2* y *ZWF1*. Los genes heterólogos D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ y 6-fosfogluconato deshidrogenasa pueden ser genes procariotas o genes sintéticos que codifican enzimas procariotas. En una realización, la célula eucariota que tiene genes heterólogos son genes procariotas que se originan a partir de *Methylobacillus*, *Gluconobacter*, *Bradyrhizobium* y *Haloferax*, por ejemplo, *Methylobacillus flagellatus*, *Gluconobacter oxydans*, *Bradyrhizobium* o *Haloferax volcanii*.

15 En una realización, la célula eucariota es una célula de levadura, por ejemplo, una célula de *Saccharomyces*, por ejemplo célula de *Saccharomyces cerevisiae*. En una realización, en la célula eucariota, se altera una acetaldehído deshidrogenasa-6 (*ALD6*). En una realización, la célula eucariota comprende una alteración de uno o más de los genes *gpp1*, *gpp2*, *gpd1* y *gpd2* nativos en la célula eucariota.

20 La célula eucariota puede comprender: h) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5) heteróloga y/o i) genes de la vía de la arabinosa, j) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una glicerol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.6) heteróloga; y k) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una dihidroxiacetona cinasa (E.C. 2.7.1.28 o E.C. 2.7.1.29) homóloga o heteróloga. En una realización, la célula eucariota es una célula eucariota fermentadora de pentosa y glucosa que es capaz de consumo simultáneo anaerobio de pentosa y glucosa. En una realización, el sustrato es un hidrolizado de material lignocelulósico. Por ejemplo, un hidrolizado enzimático de material lignocelulósico en donde el hidrolizado comprende acetato. El acetato puede estar en la concentración de acetato de 0,3 % (p/p) o más en el hidrolizado.

Las diversas realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden ser combinadas de forma cruzada.

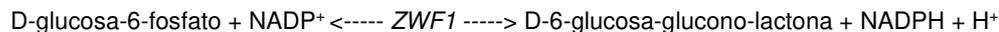
30 En una realización, la invención proporciona una célula eucariota que está genéticamente modificada que comprende:

- a) D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y/o
- b) 6-fosfogluconato deshidrogenasa;
- c) glucosa deshidrogenasa, gluconolactonasa y gluconato cinasa, en donde a) y b) y glucosa deshidrogenasa en c) son dependientes de NAD⁺;
- 35 d) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ (E.C. 1.2.1.10) heteróloga;
- e) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una acetil-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.1) homóloga o heteróloga;
- f) una alteración de una o más aldehído deshidrogenasas (E.C. 1.2.1.4) nativas en la célula eucariota
- 40 g) una modificación que conduce a la reducción de la actividad de glicerol-3-fosfato fosfohidrolasa y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, en comparación con la célula eucariota sin dicha modificación;
- h) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5) heteróloga;
- i) genes de la vía de la arabinosa
- 45 j) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una glicerol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.6) heteróloga; y/o
- k) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una dihidroxiacetona cinasa (E.C. 2.7.1.28 o E.C. 2.7.1.29) homóloga o heteróloga.

Estas características y otras realizaciones de la invención se describen más adelante con más detalle.

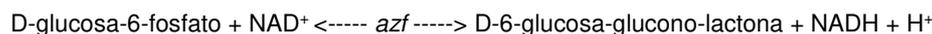
a) D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que es dependiente de NAD⁺

La enzima D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa nativa (abreviada en el presente documento G6PDH o *ZWF1*) es una enzima que es parte de la parte oxidativa de la vía de la pentosa-fosfato (vía PPP). En células eucariotas, esta enzima es dependiente de NADP⁺: La reacción catalizada por la enzima nativa es:



5 (ecuación 1)

La D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que es dependiente de NAD⁺ que se usa según la invención usa NAD⁺ como cofactor. La reacción de la enzima G6PDH dependiente de NAD⁺ es:



(ecuación 2)

10 En una realización, la G6PDH dependiente de NAD⁺ (enzima o gen) se origina a partir de un organismo procarionta. "Origina" se entiende en el presente documento que incluye a) aislado de un organismo o b) gen o proteína sintetizado basándose en la información derivada de una secuencia o proteína de gen.

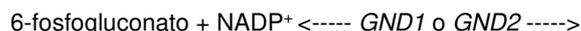
15 En una realización, G6PDH es un gen heterólogo que codifica una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 7. En una realización, el gen codifica una enzima que es una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 8. Los ejemplos adecuados de las enzimas G6PDH anteriores se dan en la Tabla 1.

Tabla 1: Enzimas G6PDH adecuadas e identidad con G6PDH WP 004044412.1

Proteína	Identidad (%)	Acceso
Epimerasa dependiente de NAD [<i>Haloferax volcanii</i>]	100	WP_004044412.1
Proteína de tipo epimerasa/deshidratasa de azúcar [<i>Haloferax sulfurifontis</i>]	98	WP_007274874.1
Epimerasa dependiente de NAD [<i>Haloferax mucosum</i>]	94	WP_008319571.1
Proteína de tipo epimerasa/deshidratasa de azúcar [<i>Haloferax larsenii</i>]	91	WP_007544789.1
Epimerasa dependiente de NAD [<i>Halogeometricum borinquense</i>]	81	WP_006056268.1
Epimerasa dependiente de NAD [<i>Halorubrum saccharovororum</i>]	75	WP_004048754.1
Epimerasa de nucleósido-difosfato-azúcar [<i>Halonotius</i> sp. J07HN6]	70	WP_021060497.1
Epimerasa dependiente de NAD [<i>Natronomonas pharaonis</i>]	62	WP_011321883.1

20 **b) 6-fosfogluconato deshidrogenasa**

La enzima nativa 6-fosfogluconato deshidrogenasa (abreviada en el presente documento 6PGDH o *GND1* o *GND2*) es una enzima que es parte de la parte oxidativa de la vía de la pentosa-fosfato (vía PPP). En células eucariotas, esta enzima es dependiente de NADP⁺: La reacción catalizada por la enzima nativa es:



25 Ribulosa-5-fosfato + NADPH + H⁺ + CO₂
(ecuación 3)

La 6-fosfogluconato deshidrogenasa que es dependiente de NAD⁺ que se usa según la invención usa NAD⁺ como cofactor. La reacción catalizada por la enzima 6PGDH dependiente de NAD⁺ es:



30 Ribulosa-5-fosfato + NADH + H⁺ + CO₂
(ecuación 4)

En una realización, la 6PGDH dependiente de NAD⁺ (enzima o gen) se origina a partir de un organismo procarionta. "Origina" se entiende en el presente documento que incluye a) aislado de un organismo o b) sintetizado basándose en la información derivada de una enzima o gen.

En una realización, 6PGDH es un gen heterólogo que codifica una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1. En una realización, el gen codifica una enzima que es una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 2. Los ejemplos adecuados de las enzimas 6PGDH anteriores se dan en la Tabla 2.

5 En una realización, 6PGDH es un gen heterólogo que codifica una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 3. En una realización, el gen codifica una enzima que es una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene 6050, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 4. Los ejemplos adecuados de las enzimas 6PGDH anteriores se dan en la Tabla 3.

10 En una realización, 6PGDH es un gen heterólogo que codifica una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 5. En una realización, el gen codifica una enzima que es una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 6. Los ejemplos adecuados de las enzimas 6PGDH anteriores se dan en la Tabla 4.

15 En una realización, las enzimas o genes 6PGDH heterólogos son genes procariontas que se originan de un organismo elegido de la lista de géneros: *Methylobacillus*, *Gluconobacter*, *Bradyrhizobium* y *Haloferax*. En una realización, las enzimas o genes 6PGDH son genes procariontas que se originan a partir de un organismo elegido de la lista de especies: *Methylobacillus flagellatus*, *Gluconobacter oxydans*, *Bradyrhizobium* y *Haloferax volcanii*. Los ejemplos de proteínas 6PGDH adecuadas se dan en las Tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2: Enzimas 6PGDH adecuadas e identidad con AAF34407.1; 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*Methylobacillus flagellates* 6PGDH)

Proteína	Identidad (%)	Acceso
6-fosfogluconato deshidrogenasa unida a NAD [<i>Methylobacillus flagellatus</i>] (<i>gndA</i>)	100	AAF34407.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Methylobacillus glycozenes</i>]	90	WP_025869439.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Methylovorus glucosotrophus</i>]	82	WP_015829859.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Methylovorus</i> sp. MP688]	82	WP_013441936.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Methylothermus versatilis</i>]	81	WP_047538584.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Methylophilus</i> sp. 5]	80	WP_029148659.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Sulfuricella denitrificans</i>]	75	WP_009206043.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Candidatus Methylopusillus planktonicus</i>]	70	WP_046487838.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>]	66	WP_012637452.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Thermithiobacillus tepidarius</i>]	60	WP_028989561.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Deinococcus ficus</i>]	58	WP_027462489.1

20 **Tabla 3: Proteínas 6PGDH adecuadas e identidad con WP 011253227.1; 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*Gluconobacter oxydans* 6PGDH)**

Proteína	Identidad (%)	Acceso
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Gluconobacter oxydans</i>]	100	WP_011253227.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Gluconobacter oxydans</i>]	99	WP_041112000.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Gluconobacter morbifer</i>]	86	WP_008850548.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Gluconobacter oxydans</i>]	84	WP_046899919.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Asaia astilbis</i>]	77	WP_025823114.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Acetobacter cibernongensis</i>]	76	WP_048838399.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Komagataeibacter xylinus</i>]	75	WP_048857212.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Granulibacter bethesdensis</i>]	67	WP_011631561.1

Tabla 4: Proteínas 6PGDH adecuadas e identidad con WP_011089498.1; 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Bradyrhizobium 6PGDH)

Proteína	Identidad (%)	Acceso
MÚLTIPLES ESPECIES: 6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Bradyrhizobium</i>]	100	WP_011089498.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM2254]	98	WP_027546897.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Bradyrhizobium japonicum</i>]	95	WP_024339411.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Bradyrhizobium elkani</i>]	83	WP_028347094.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Rhodopseudomonas palustris</i>]	77	WP_011440787.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Microvirga lupini</i>]	75	WP_036351036.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilante) [<i>Afipia felis</i>]	72	WP_002718635.1
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>Methylobacterium oryzae</i>]	71	WP_043757546.1

5 c) glucosa deshidrogenasa, gluconolactonasa y gluconato cinasa

En una realización, la célula comprende glucosa deshidrogenasa, gluconolactonasa y gluconato cinasa. La introducción de estos genes y la expresión de las enzimas correspondientes conducen a las siguientes reacciones en la célula:



10 (ecuación 5), seguido por:



(ecuación 6), seguido por:



(ecuación 7) que completa la vía de la glucosa a 6-P-gluconato.

15 Estas enzimas (designadas c1), c2) y c3), respectivamente, se describen ahora con más detalle.

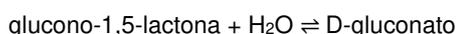
c1) glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.118) dependiente de NAD⁺ es una enzima que cataliza la reacción química



(ecuación 8)

20 Así, los dos sustratos de esta enzima son D-glucosa y aceptor, mientras que sus dos productos son D-glucono-1,5-lactona y aceptor reducido. Esta enzima pertenece a la familia de las oxidorreductasas, específicamente las que actúan sobre el grupo de donante CH-OH con otros aceptores. El nombre sistemático de esta clase de enzimas es D-glucosa:aceptor 1-oxidorreductasa. Otros nombres en uso común incluyen glucosa deshidrogenasa (*Aspergillus*), glucosa deshidrogenasa (descarboxilante) y D-glucosa:(aceptor) 1-oxidorreductasa. Esta enzima participa en la vía de la pentosa-fosfato. Emplea un cofactor, FAD.

c2) Gluconolactonasa (EC 3.1.1.17) es una enzima que cataliza la reacción química



(ecuación 9)

30 Así, los dos sustratos de esta enzima son D-glucono-1,5-lactona y H₂O, mientras que su producto es D-gluconato. Esta enzima pertenece a la familia de las hidrolasas, específicamente las que actúan sobre enlaces éster carboxílico. El nombre sistemático de esta clase de enzimas es D-glucono-1,5-lactona lactonohidrolasa. Otros nombres en uso común incluyen lactonasa, aldonolactonasa, glucono-delta-lactonasa y gluconolactonasa. Esta enzima participa en la vía de la pentosa-fosfato.

c3) Gluconato cinasa o gluconocinasa (EC 2.7.1.12) es una enzima que cataliza la reacción química:

(ecuación 10)

5 Así, los dos sustratos de esta enzima son ATP y D-gluconato, mientras que sus dos productos son ADP y 6-fosfo-D-gluconato.

Esta enzima pertenece a la familia de las transferasas, específicamente los grupos que contienen fósforo de transferencia (fosfotransferasas) con un grupo alcohol como aceptor. El nombre sistemático de esta clase de enzimas es ATP:D-gluconato 6-fosfotransferasa. Otros nombres en uso común incluyen gluconocinasa (fosforilante) y gluconato cinasa. Esta enzima participa en la vía de la pentosa-fosfato.

10 d) acetaldehído deshidrogenasa (acetilante) (EC 1.2.1.10)

La célula de la invención puede comprender además un gen exógeno que codifica una enzima con la capacidad para reducir acetyl-CoA en acetaldehído, gen que confiere a la célula la capacidad de convertir acetyl-CoA (y/o ácido acético) en etanol. Una enzima con la capacidad para reducir acetyl-CoA en acetaldehído se entiende en el presente documento como una enzima que cataliza la reacción (ACDH; EC 1.2.1.10):



Así, la enzima cataliza la conversión de acetyl-CoA en acetaldehído (y viceversa) y también se denomina una acetaldehído deshidrogenasa (acetilante dependiente de NAD) o una acetyl-CoA reductasa. La enzima puede ser una enzima bifuncional que cataliza además la conversión de acetaldehído en etanol (y viceversa; véase más adelante). Por comodidad, los presentes inventores se deben referir en el presente documento a una enzima que tiene al menos la capacidad de reducir acetyl-CoA en o acetaldehído o etanol como una "acetaldehído deshidrogenasa". Se entiende además en el presente documento que la célula tiene actividades de alcohol deshidrogenasa endógena que permiten a la célula, que se proporciona con actividad de acetaldehído deshidrogenasa, completar la conversión de acetyl-CoA en etanol. Además, la célula tiene acetyl-CoA sintetasa endógena o exógena, que permite que la célula, que se proporciona con actividad de acetaldehído deshidrogenasa, complete la conversión de ácido acético (mediante acetyl-CoA) en etanol.

El gen exógeno puede codificar una enzima monofuncional que tiene solo actividad de acetaldehído deshidrogenasa (es decir, una enzima que solo tiene la capacidad de reducir acetyl-CoA en acetaldehído) tal como, por ejemplo, la acetaldehído deshidrogenasa codificada por el gen *mhpF* de *E.coli* o el gen *EutE* de *E. coli* (la parte que codifica actividad de acetaldehído deshidrogenasa).

30 Los ejemplos adecuados de procariontes que comprenden enzimas monofuncionales con actividad de acetaldehído deshidrogenasa se proporcionan en la Tabla 5. Las secuencias de aminoácidos de estas enzimas monofuncionales están disponibles en bases de datos públicas y se pueden usar por el experto para diseñar secuencias de nucleótidos de codones optimizados que codifican la enzima monofuncional correspondiente.

Tabla 5: Enzimas adecuadas con actividad de acetaldehído deshidrogenasa e identidad con *mhpF* de *E.coli*

Organismo	Identidad de aminoácidos (%)
<i>Escherichia coli</i> str. K12 substr. MG1655	100 %
<i>Shigella sonnei</i>	100 %
<i>Escherichia coli</i> IA139	99 %
<i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220	93 %
<i>Citrobacter</i> sp. 30_2	92 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342)	87 %
<i>Klebsiella variicola</i>	87 %
<i>Pseudomonas putida</i>	81 %
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	82 %
<i>Burkholderia</i> sp. H160	81 %

Organismo	Identidad de aminoácidos (%)
<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	79 %
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	70 %
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	67 %
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	68 %
<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	67 %
<i>Polaromonas</i> sp. JS666	68 %
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	70 %
<i>Rhodococcus opacus</i> B4	64 %

- 5 En una realización, la célula comprende un gen exógeno que codifica una enzima bifuncional con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, gen que confiere a la célula la capacidad de convertir acetyl-CoA en etanol. La ventaja de uso de una enzima bifuncional con actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, en lugar de separar enzimas para cada una de las actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, es que permite que la canalización directa del producto intermedio entre enzimas que catalizan reacciones consecutivas en una vía ofrezca la posibilidad de un medio eficiente, exclusivo y protegido del suministro de metabolitos. La canalización de sustratos disminuye así el tiempo de tránsito de los productos intermedios, previene la pérdida de productos intermedios por difusión, protege productos intermedios lábiles de disolvente, e impide la entrada de productos intermedios en vías metabólicas que compiten. La enzima bifuncional, por tanto, permite una conversión más eficiente de acetyl-CoA en etanol en comparación con las enzimas acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa separadas. Una ventaja adicional de uso de la enzima bifuncional es que también se puede usar en células que tienen poca o ninguna actividad de alcohol deshidrogenasa en la condición usada, tales como, por ejemplo, condiciones anaerobias y/o condiciones de represión de catabolitos.
- 10
- 15 Se conocen en la técnica enzimas bifuncionales con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa. Pueden estar presentes en procariontes y protozoos, que incluyen, por ejemplo, las enzimas bifuncionales codificadas por los genes *adhE* de *Escherichia coli* y *ADH2* de *Entamoeba histolytica* (véanse, por ejemplo, Bruchaus y Tannich, 1994, J. Biochem., 303: 743-748; Burdette y Zeikus, 1994, J. Biochem. 302: 163-170; Koo et al., 2005, Biotechnol. Lett. 27: 505-510; Yong et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93: 6464-6469). Las enzimas bifuncionales con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa son proteínas más grandes que consisten en aproximadamente 900 aminoácidos y son bifuncionales por que presentan tanto actividad de acetaldehído deshidrogenasa (ACDH; EC 1.2.1.10) como alcohol deshidrogenasa (ADH; EC 1.1.1.1). *adhE* de *E. coli* y *ADH2* de *Entamoeba histolytica* muestran 45 % de identidad de aminoácidos. Los ejemplos adecuados de enzimas bifuncionales con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa e identidad con *adhE* de *E. coli* se dan en la Tabla 6. Los ejemplos adecuados de enzimas bifuncionales con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa e identidad con *ADH2* de *Entamoeba histolytica* se dan en la Tabla 7.
- 20
- 25

Tabla 6: Enzimas bifuncionales adecuadas con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa e identidad con *adhE* de *E. coli*

Organismo	Identidad de aminoácidos (%)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	100 %
<i>Shigella sonnei</i>	100 %
<i>Shigella dysenteriae</i> 1012	99 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	97 %
<i>Enterobacter</i> sp. 638	94 %
<i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001	90 %
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	90 %
<i>Pectobacterium carotovorum</i> WPP14	90 %

Organismo	Identidad de aminoácidos (%)
<i>Sodalis glossinidius</i> str. 'morsitans'	87 %
<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	86 %
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	81 %
<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016]	76 %

Tabla 7: Enzimas bifuncionales adecuadas con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa e identidad con ADH2 de *Entamoeba histolytica*

Organismo	Identidad de aminoácidos (%)
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	99 %
<i>Entamoeba dispar</i> SAW760	98 %
<i>Mollicutes bacterium</i> D7	65 %
<i>Fusobacterium mortiferum</i> ATCC 9817	64 %
<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	63 %
<i>Pasteurella multocida</i> Pm70	62 %
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> MBEL55E	61 %
<i>Streptococcus</i> sp. 2_1_36FAA]	61 %

5 **Tabla 8: Enzimas adecuadas con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa e identidad con EutE de *E. coli***

Organismo	Identidad de aminoácidos (%)
<i>Escherichia coli</i> (EutE)	100 %
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	99 %
<i>Shigella boydi</i>	98 %
<i>Salmonella typhimurium</i>	94 %
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Weltevreden</i>	94 %
<i>Salmonella choleraesuis</i>	93 %
<i>Citrobacter youngae</i>	93 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	92 %
<i>Yersinia intermedia</i>	80 %
<i>Photobacterium profundum</i>	59 %
<i>Bilophila wadsworthia</i>	60 %
<i>Shewanella benthica</i>	58 %
<i>Thermincola potens</i>	51 %
<i>Acetonema longum</i>	50 %

5 Para la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima bifuncional que tiene actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, o la enzima que tiene actividad de acetaldehído deshidrogenasa, la secuencia de nucleótidos (a expresar) se pone en una construcción de expresión en donde se une operativamente a regiones de expresión/secuencias reguladoras adecuadas para garantizar la expresión de la enzima tras la transformación de la construcción de expresión en la célula de la invención (véase anteriormente). Promotores adecuados para la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima que tiene la enzima bifuncional que tiene actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, o la enzima que tiene actividad de acetaldehído deshidrogenasa, incluyen promotores que son preferentemente insensibles a la represión de catabolitos (glucosa), que son activos en condiciones anaerobias y/o que preferentemente no requieren xilosa o arabinosa para la inducción. Los ejemplos de dichos promotores se dan anteriormente.

10 Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima bifuncional que tiene actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, o la enzima que tiene actividad de acetaldehído deshidrogenasa, se adapta para optimizar su uso de codones al de la célula en cuestión (como se ha descrito anteriormente).

15 **e) acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1);**

La célula de la invención puede comprender un gen que codifica una enzima que tiene la actividad específica de acetil-CoA sintetasa. La acetil-CoA sintetasa o acetato-CoA ligasa es una enzima (EC 6.2.1.1) implicada en el metabolismo de los azúcares de carbono. Está en la clase de ligasas de las enzimas, que significa que cataliza la formación de un nuevo enlace químico entre dos moléculas grandes.

20 Las dos moléculas unidas por acetil-CoA sintetasa son acetato y coenzima A (CoA). La reacción con los sustratos y productos incluidos es:



La forma Acs1 y la forma Acs2 de acetil-CoA sintetasa están codificadas por los genes ACS1 y ACS2, respectivamente.

25 Los ejemplos adecuados de enzimas con actividad de acetil-CoA sintetasa se proporcionan en la Tabla 9.

Tabla 9: ACS adecuadas con identidad con proteína ACS2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Descripción	Identidad (%)	Acceso Nº
acetato--CoA ligasa ACS2 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	100	NP_013254.1
acetil CoA sintetasa [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789]	99	EDN59693.1
acetato--CoA ligasa [<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-1140]	85	XP_453827.1
acetato--CoA ligasa [<i>Candida glabrata</i> CBS 138]	83	XP_445089.1
acetato--CoA ligasa [<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054]	68	XP_001385819.1
acetil-coenzima A sintetasa FacA [<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163]	63	EDP50475.1
acetato--CoA ligasa facA- <i>Penicillium chrysogenum</i> [<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255]	62	XP_002564696.1

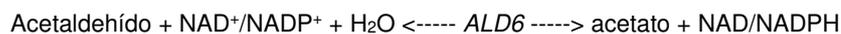
f) Alteración de una o más aldehído deshidrogenasas (E.C. 1.2.1.4) nativas en la célula eucariota.

30 La enzima que se puede alterar según la invención es una aldehído deshidrogenasa aldehído deshidrogenasa (E.C: 1.2.1.4) nativa en la célula eucariota.

En una realización, la aldehído deshidrogenasa nativa en la célula eucariota es acetaldehído deshidrogenasa-6 (*ALD6*).

ALD6 es en el presente documento cualquier enzima activada por Mg²⁺ que catalice la deshidrogenación de acetaldehído en acetato, y viceversa.

35 La reacción que se cataliza por *ALD6* es:



(Ecuación 13)

La enzima ALD6 en la Ecuación 13 genera NADPH y acetato. Por ese motivo, en el contexto de la presente invención, la alteración o delección de ALD6 es una realización preferida.

Una ventaja adicional de la delección de *ALD6* es evidente si la cepa según la invención comprende una acetaldehído deshidrogenasa acetilante (por ejemplo, adhE o acdH) (véase d) y los documentos de patente WO2015028583 y WO2015028582)). La combinación de acetaldehído deshidrogenasa acetilante y *ALD6* en una célula eucariota según la invención puede conducir a un ciclo inútil que consume ATP. La delección de *ALD6* rompe el ciclo inútil, de manera que se evita el consumo de ATP por el ciclo inútil. En una realización de la invención, se deleciona la célula eucariota, una *ALD6* de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se ilustra en la Figura 4.

Las secuencias de nucleótidos de ALD6 adecuadas para alteración con identidad con la secuencia de nucleótidos de ALD6 de *Saccharomyces cerevisiae* en otras células eucariotas se dan en la Tabla 10.

Tabla 10: Secuencias de nucleótidos ALD6 adecuadas para alteración que ocurren en diferentes tipos de célula eucariota

Especie y cepa	Número de acceso	% de ID
aldehído deshidrogenasa (NADP(+)) ALD6 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	NP_015264.1	100
Ald6p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AWRI796]	EGA72659.1	99
aldehído deshidrogenasa 6 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces kudriavzevii</i>]	CCD31406.1	97
proteína hipotética NDAI_0E02900 [<i>Naumovozyma dairenensis</i> CBS 421]	XP_003670350.1	80
aldehído deshidrogenasa activada por magnesio [<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]	BAP69922.1	74
aldehído deshidrogenasa (NAD+) [<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>]	XP_011273253.1	63
aldehído deshidrogenasa [<i>Brettanomyces bruxellensis</i> AWRI 1499] [<i>Dekkera bruxellensis</i> AWRI 1499]	EIF46557.1	56

g) una modificación que conduce a la reducción de la actividad de glicerol-3-fosfato fosfohidrolasa y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

La célula eucariota adicional puede comprender además una modificación que conduce a la reducción de la actividad de glicerol-3-fosfato fosfohidrolasa y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, en comparación con la célula eucariota sin dicha modificación.

En esa realización, la célula puede comprender una alteración de una o más secuencia de nucleótidos endógenas que codifican un gen de glicerol-3-fosfato fosfohidrolasa y/o que codifican un gen de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.

En dicha realización, la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH se reduce o deleciona. La reducción o delección de esta actividad enzimática se puede lograr modificando uno o más genes que codifican una actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) dependiente de NAD, o uno o más genes que codifican una actividad de glicerol fosfato fosfatasa (GPP), de forma que la enzima se expresa considerablemente menos en el no mutante o de forma que el gen codifique un polipéptido con actividad reducida.

Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo usando técnicas biotecnológicas comúnmente conocidas, y pueden en particular incluir una o más mutaciones inactivantes o mutagénesis dirigida al sitio de regiones promotoras o regiones codificantes de los genes estructurales que codifican GPD y/o GPP. Alternativamente, las cepas de células eucariotas que son defectuosas en la producción de glicerol se pueden obtener por mutagénesis aleatoria seguida por selección de cepas con actividad reducida o ausente de GPD y/o GPP. Los genes *GPD1*, *GPD2*, *GPP1* y *GPP2* de *S. cerevisiae* se muestran en el documento de patente WO2011010923, y se desvelan en SEQ ID NO: 24-27 de esa solicitud.

Así, en las células de la invención, se pueden reducir la glicerol-3-fosfato fosfohidrolasa específica y/o que codifica un gen glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. En las células de la invención, la actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa específica se reduce preferentemente en al menos un factor de 0,8, 0,5, 0,3, 0,1, 0,05 o 0,01 en comparación con una cepa que es genéticamente idéntica, excepto por la modificación genética que causa la reducción en la actividad específica, preferentemente en condiciones anaerobias. La actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa se puede determinar como se describe por Overkamp et al. (2002, Eukaryotic cell 19:509-520).

Un gen preferido que codifica una glicerolfosfato deshidrogenasa cuya actividad se va a reducir o inactivar en la célula de la invención es *GPD1* de *S. cerevisiae* como se describe por van den Berg y Steensma (1997, Eukaryotic cell 13:551-559), que codifica la secuencia de aminoácidos *GPD1* y ortólogos de los mismos en otras especies.

5 Los ejemplos adecuados de una enzima con actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa que pertenece al género *Saccharomyces*, *Naumovozyrna*, *Candida*, *Vanderwaltozyma* y *Zygosaccharomyces* se proporcionan en la Tabla 11.

Tabla 11: Enzimas adecuadas con actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa (GPD1) caracterizadas por fuente de organismo e identidad de aminoácidos con glicerolfosfato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (GPD1)

Organismo	Identidad de aminoácidos (%)
<i>S. cerevisiae</i>	100 %
<i>Naumovozyrna dairenensis</i>	79 %
<i>Naumovozyrna castelii</i>	80 %
<i>Candida glabrata</i>	77 %
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	77 %
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	74 %
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	61 %

10 Sin embargo, en algunas cepas, por ejemplo de *Saccharomyces*, *Candida* y *Zygosaccharomyces*, un segundo gen que codifica una glicerolfosfato deshidrogenasa es activo, es decir, *GPD2*. Otro gen preferido que codifica una glicerolfosfato deshidrogenasa cuya actividad se va a reducir o inactivar en la célula de la invención es, por tanto, *GPD2* de *S. cerevisiae*, que codifica la secuencia de aminoácidos de *GPD2* y ortólogos del mismo de otras especies.

15 Los ejemplos adecuados de organismos (hospedadores) que comprenden una enzima con actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa que pertenece al género (*Zygo*)*Saccharomyces* y *Candida* se proporcionan en la Tabla 12.

Tabla 12: Enzimas adecuadas con actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa (GPD2) caracterizadas por fuente de organismo e identidad de aminoácidos con glicerolfosfato deshidrogenasa (GPD2) de *S. cerevisiae*

Organismo	Identidad de aminoácidos (%)
<i>S. cerevisiae</i>	100 %
<i>Candida glabrata</i>	75 %
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	73 %
<i>Spathaspora passalidarum</i>	62 %
<i>Scheffersomyces stipites</i>	61 %

20 En una realización, la célula es una célula eucariota en donde el genoma de la célula eucariota comprende una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo de *GPD1*, *GPD2*, *GPP1* y *GPP2*, mutación que puede ser una mutación inactivante, mutación inactivante que puede ser una delección completa de al menos uno de dicho genes en comparación con el gen de células eucariotas no mutantes correspondientes a la célula eucariota.

h) Xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5).

En una realización, la célula eucariota puede comprender una xilosa isomerasa ((E.C. 5.3.1.5); *xyIA*).

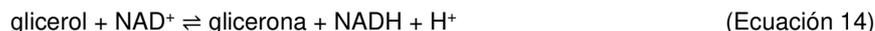
Una "xilosa isomerasa" (E.C. 5.3.1.5) se define en el presente documento como una enzima que cataliza la isomerización directa de D-xilosa en D-xilulosa y/o viceversa. La enzima también se conoce como una D-xilosa cetoisomerasa. Una xilosa isomerasa en el presente documento también puede ser capaz de catalizar la conversión entre D-glucosa y D-fructosa (y, por consiguiente, se puede denominar, por tanto, una glucosa isomerasa). En general, una xilosa isomerasa requiere un catión bivalente, tal como magnesio, manganeso o cobalto como cofactor.

i) Enzimas de la vía de la arabinosa (L-arabinosa isomerasa (*araA*), L-ribulocinasa (*araB*) y L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa (*araD*))

En una realización, la célula comprende genes que expresan enzimas de una vía de fermentación de la L-arabinosa. El documento de patente EP 1 499 708 desvela la construcción de una cepa fermentadora de L-arabinosa por expresión en exceso de la vía de la L-arabinosa. En la vía, las enzimas L-arabinosa isomerasa (*araA*), L-ribulocinasa (*araB*) y L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa (*araD*) participan convirtiendo L-arabinosa en L-ribulosa, L-ribulosa-5-P y D-xilulosa-5-P, respectivamente.

j) Glicerol deshidrogenasa (EC 1.1.1.6)

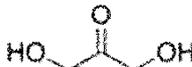
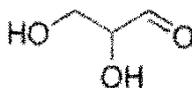
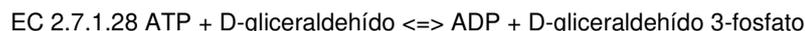
Una glicerol deshidrogenasa se entiende en el presente documento como una enzima que cataliza la reacción química (EC 1.1.1.6):



Otros nombres en uso común incluyen glicerina deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa unida a NAD⁺ y glicerol:NAD⁺ 2-oxidorreductasa. Preferentemente, la modificación genética provoca la expresión en exceso de una glicerol deshidrogenasa, por ejemplo, por expresión en exceso de una secuencia de nucleótidos que codifica una glicerol deshidrogenasa. La secuencia de nucleótidos que codifica la glicerol deshidrogenasa puede ser endógena para la célula o puede ser una glicerol deshidrogenasa que es heteróloga para la célula. Las secuencias de nucleótidos que se pueden usar para la expresión en exceso de glicerol deshidrogenasa en las células de la invención son, por ejemplo, el gen glicerol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (*GCY1*) como se describe, por ejemplo, por Oechsner et al. (1988, FEBS Lett. 238: 123-128) o Voss et al. (1997, Eukaryotic cell 13: 655-672).

k) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una dihidroxiacetona cinasa (E.C. 2.7.1.28 o E.C. 2.7.1.29) homóloga o heteróloga

Una dihidroxiacetona cinasa se entiende en el presente documento como una enzima que cataliza una de las reacciones químicas:



(Ecuación 15)

Glicerona = dihidroxiacetona.

Otros nombres en uso común incluyen glicerona cinasa, ATP:glicerona fosfotransferasa y acetol cinasa (fosforilante). Se entiende que la glicerona y la dihidroxiacetona son la misma molécula. Preferentemente, la modificación genética provoca la expresión en exceso de una dihidroxiacetona cinasa, por ejemplo, por expresión en exceso de una secuencia de nucleótidos que codifica una dihidroxiacetona cinasa. La secuencia de nucleótidos que codifica la dihidroxiacetona cinasa puede ser endógena para la célula o puede ser una dihidroxiacetona cinasa que es heteróloga para la célula. Las secuencias de nucleótidos que se pueden usar para la expresión en exceso de dihidroxiacetona cinasa en las células de la invención son, por ejemplo, los genes de dihidroxiacetona cinasa de *S. cerevisiae* (*DAK1*) y (*DAK2*) como se describe, por ejemplo, por Molin et al. (2003, J. Biol. Chem. 278:1415-1423).

Los ejemplos adecuados de enzimas con actividad de glicerol deshidrogenasa se proporcionan en la Tabla 13.

Tabla 13: GCY adecuadas con identidad con proteína GCY1 de GCY1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Descripción	Identidad (%)	Número de acceso
Gcy1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	100 %	NP_014763.1
proteína de tipo GCY1 [<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO 1802]	89 %	EJT43197.1
proteína hipotética KNAG_0C04910 [<i>Kazachstania naganishii</i> CBS 8797]	69 %	CCK69592.1
Ypr1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	65 %	NP_010656.1
Aldo/ceto reductasa [<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054] >gb ABN65453.1	55 %	XP_001383482.1

Los ejemplos adecuados de enzimas con actividad de dihidroxi acetona cinasa se proporcionan en la Tabla 14.

Tabla 14: DAK adecuadas con identidad con DAK1 proteína de *Saccharomyces cerevisiae*.

Descripción	Identidad (%)	Número de acceso
Dak1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	100	NP_013641.1
dihidroxiacetona cinasa [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM789]	99	EDN64325.1
proteína de tipo DAK1 [<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO 1802]	95	EJT44075.1
ZYBA0S11-03576g1_1 [<i>Zygosaccharomyces bailii</i> CLIB 213]	77	CDF91470.1
proteína hipotética [<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-1140]	70	XP_451751.1
proteína hipotética [<i>Candida glabrata</i> CBS 138]	63	XP_449263.1
Dak2p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	44	NP_116602.1

5

Otras realizaciones de la invención se describen ahora con más detalle.

La invención se refiere además a una célula eucariota como se describe en el presente documento en la fermentación en la industria vitivinícola.

10 En otra realización, la invención se refiere al uso de la célula eucariota como se describe en el presente documento en la fermentación en la industria de los bicombustibles.

15 Además, la invención se refiere a un proceso para la fermentación de un sustrato para producir un producto de fermentación con un eucariota como se describe en el presente documento, en la industria de los biocombustibles del vino, en donde el consumo de acetato es elevado al menos 10 %, al menos 20 %, o al menos 25 %, con respecto a la fermentación correspondiente con célula eucariota no mutante. En una realización de la misma, el rendimiento del etanol es al menos aproximadamente 0,5 %, o al menos 1 % superior al de un proceso con la célula eucariota no mutante correspondiente. En dicho proceso, se cofermentan preferentemente pentosa y glucosa. En dicho proceso, se puede fermentar un hidrolizado de material lignocelulósico. El hidrolizado puede ser un hidrolizado enzimático de material lignocelulósico. Dicho hidrolizado puede comprender acetato. El hidrolizado que comprende acetato puede tener una concentración de acetato de 0,3 % (p/p) o más.

20 La célula eucariota puede contener genes de una vía metabólica de la pentosa no nativa para la célula eucariota y/o que permite que la célula eucariota convierta pentosa(s). En una realización, la célula eucariota puede comprender una o dos o más copias de una o más xilosa isomerasas y/o una o dos o más copias de uno o más genes de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, que permiten que la célula eucariota convierta xilosa. En una realización de la misma, estos genes se pueden integrar en el genoma de la célula eucariota. En otra realización, la célula eucariota comprende los genes *araA*, *araB* y *araD*. Entonces es capaz de fermentar arabinosa. En una realización de la invención, la célula eucariota comprende el gen *xyIA*, gen *XYL1* y gen *XYL2* y/o gen *XKS1*, para permitir que la célula eucariota fermente xilosa; delección del gen aldosa reductasa (*GRE3*); expresión en exceso de genes *PPP*, *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RKI1* para permitir el aumento de flujo a través de la vía de la pentosa fosfato en la célula, y/o expresión en exceso de *GAL2* y/o delección de *GAL80*. Así, mediante la inclusión de los genes anteriores, se pueden introducir pentosa adecuada u otra(s) vía(s) metabólica(s) en la célula eucariota que fueron no nativas en la célula eucariota (no mutante). Según una realización, se pueden introducir los siguientes genes en la célula eucariota por introducción en una célula hospedadora:

30

- 1) un conjunto que consiste en los genes PPP *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RK11*, opcionalmente bajo el control de promotor constitutivo fuerte;
- 2) un conjunto que consiste en un gen *xyIA* bajo el control de promotor constitutivo fuerte;
- 3) un conjunto que comprende un gen *XKS1* bajo el control de promotor constitutivo fuerte,
- 5 4) un conjunto que consiste en los genes *araA*, *araB* y *araD* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte
- 5) delección de un gen de aldosa reductasa

Las células anteriores se pueden construir usando técnicas de expresión recombinante conocidas. La modificación del cofactor se puede efectuar antes, simultáneamente o después de cualquiera de las modificaciones 1)-5).

- 10 La célula eucariota según la invención se puede someter a ingeniería evolutiva para mejorar sus propiedades. Los procesos de ingeniería evolutiva son procesos conocidos. La ingeniería evolutiva es un proceso en donde fenotipos industrialmente relevantes de un microorganismo, en el presente documento la célula eucariota, se pueden acoplar a la velocidad de crecimiento específica y/o la afinidad por un nutriente, por un proceso de selección natural racionalmente establecida. La ingeniería evolutiva se describe con detalle, por ejemplo, en Kuijper, M, et al, FEMS Eukaryotic cell Research 5(2005) 925-934, documentos de patente WO2008041840 y WO2009112472. Después de la ingeniería evolutiva, se aísla la célula eucariota que fermenta la pentosa resultante. El aislamiento puede ser realizado de cualquier modo conocido, por ejemplo por separación de células de un caldo de células eucariotas usado en la ingeniería evolutiva, por ejemplo, tomando una muestra de células o por filtración o centrifugación.

- 20 En una realización, la célula eucariota está libre de marcador. Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección, o el cribado, de una célula hospedadora que contiene el marcador. Libre de marcador significa que los marcadores están esencialmente ausentes en la célula eucariota. El estar libre de marcador es particularmente ventajoso cuando se han usado marcadores antibióticos en la construcción de la célula eucariota y se retiran de aquí. La retirada de marcadores se puede hacer usando cualquier técnica adecuada del estado de la técnica, por ejemplo recombinación intramolecular.

- 25 En una realización, la célula eucariota industrial se construye basándose en una célula hospedadora tolerante a inhibidor, en donde la construcción se realiza como se describe en lo sucesivo. Las células hospedadoras tolerantes a inhibidor se pueden seleccionar cribando cepas para el crecimiento sobre materiales que contienen inhibidores, tal como se ilustra en Kadar et al, Appl. Biochem. Biotechnol. (2007), Vol. 136-140, 847-858, en donde se seleccionó una cepa ATCC 26602 de *S. cerevisiae* tolerante a inhibidor.

- 30 La célula eucariota adicional puede comprender las actividades enzimáticas requeridas para la conversión de piruvato en un producto de fermentación deseado, tal como etanol, butanol (por ejemplo, n-butanol, 2-butanol e isobutanol), ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, un antibiótico β -lactámico o una cefalosporina.

- 35 En una realización, la célula eucariota deriva de una célula eucariota industrial. Una célula industrial y célula eucariota industrial se pueden definir del siguiente modo. Los entornos vivos de células (células eucariotas) en procesos industriales son significativamente diferentes de aquellos en el laboratorio. Las células eucariotas industriales deben ser capaces de rendir bien en múltiples condiciones medioambientales que pueden variar durante el proceso. Dichas variaciones incluyen cambio en las fuentes de nutrientes, pH, concentración de etanol, temperatura, concentración de oxígeno, etc., que juntos tienen un posible impacto sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae*. En condiciones industriales adversas, las cepas tolerantes medioambientales deben permitir el robusto crecimiento y producción. Las cepas de células eucariotas industriales son, en general, más robustas hacia estos cambios en las condiciones medioambientales que pueden ocurrir en las aplicaciones en las que se usan, tales como en la industria panificadora, industria cervecera, fabricación de vino y la industria de biocombustible de etanol. En una realización, la célula eucariota industrial se construye basándose en una célula hospedadora industrial, en donde la construcción se realiza como se describe en lo sucesivo. Los ejemplos de célula eucariota industrial (*S. cerevisiae*) son Ethanol Red® (Fermentis), Fermiol® (DSM) y Thermosacc® (Lallemand).

- 50 Las células eucariotas según la invención son preferentemente tolerantes a inhibidor, es decir, pueden resistir a inhibidores comunes al nivel que normalmente tienen con condiciones comunes de pretratamiento e hidrólisis, de manera que las células eucariotas pueden encontrar una amplia aplicación, es decir, tienen alta aplicabilidad para diferente materia prima, diferentes métodos de pretratamiento y diferentes condiciones de hidrólisis. En una realización, la célula eucariota es tolerante a inhibidor. La tolerancia a inhibidor es resistencia a compuestos inhibidores. La presencia y el nivel de compuestos inhibidores en lignocelulosa pueden variar ampliamente con la variación de materia prima, método de pretratamiento, proceso de hidrólisis. Los ejemplos de categorías de inhibidores son ácidos carboxílicos, furanos y/o compuestos fenólicos. Los ejemplos de ácidos carboxílicos son ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico. Los ejemplos de furanos son furfural e hidroximetilfurfural. Los ejemplos o

compuestos fenólicos son vainillina, ácido siríngico, ácido ferúlico y ácido cumárico. Las cantidades típicas de inhibidores son, para ácidos carboxílicos: varios gramos por litro, hasta 20 gramos por litro o más, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis. Para furanos: varios cientos de miligramos por litro hasta varios gramos por litro, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis. Para

5

fenólicos: varias decenas de miligramos por litro, hasta un gramo por litro, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis.

En una realización, la célula eucariota es una célula que es naturalmente capaz de fermentación alcohólica, preferentemente, fermentación alcohólica anaerobia. Una célula eucariota tiene preferentemente una alta tolerancia a etanol, una alta tolerancia a pH bajo (es decir, capaz de crecimiento a un pH más bajo que aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2,5) y hacia orgánicos y/o una alta tolerancia a temperaturas elevadas.

10

Además, la invención se refiere a un proceso para la fermentación de un sustrato para producir un producto de fermentación con una célula eucariota como se describe en el presente documento, en la industria vitivinícola, en donde el rendimiento del glicerol es al menos 5 %, al menos 10 % o al menos 10 %, al menos 20 % o al menos 30 % superior al de un proceso con la célula eucariota no mutante correspondiente. En una realización de dicho proceso, el rendimiento del etanol no es elevado o reducido, en comparación con el de un proceso con la célula eucariota no mutante correspondiente.

15

Cualquiera de las características anteriores o actividades de una célula eucariota pueden estar naturalmente presentes en la célula, o se pueden introducir o modificar por modificación genética.

20

Expresión recombinante

La célula eucariota es una célula recombinante. Es decir, una célula eucariota comprende, o se transforma con, o se modifica genéticamente con, una secuencia de nucleótidos que no ocurre naturalmente en la célula en cuestión.

Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para la expresión recombinante de enzimas en una célula, así como para las modificaciones genéticas adicionales de una célula eucariota. Normalmente, dichas técnicas implican la transformación de una célula con construcción de ácidos nucleicos que comprende la secuencia relevante. Dichos métodos se conocen, por ejemplo, de los libros de texto estándar, tales como Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, o F. Ausubel et al., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Los métodos de transformación y modificación genética de células hospedadoras fúngicas se conocen de, por ejemplo, los documentos de patente EP-A-0635 574, WO 98/46772, WO 99/60102, WO 00/37671, WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 y US 6.265.186.

25

30

Producción de bioproductos

A lo largo de los años se han hecho sugerencias para la introducción de diversos organismos para la producción de bioetanol a partir de azúcares de cultivos. En la práctica, sin embargo, todos los procesos de producción de bioetanol importantes han continuado usando células eucariotas del género *Saccharomyces* como productor de etanol. Esto es debido a las muchas características atractivas de las especies de *Saccharomyces* para procesos industriales, es decir, una alta tolerancia a ácidos, etanol y osmotolerancia, capacidad de crecimiento anaerobio y, por supuesto, su alta capacidad fermentativa alcohólica. Las especies preferidas de células eucariotas como células hospedadoras incluyen *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* o *K. fragilis*.

35

40

Una célula eucariota puede ser una célula adecuada para la producción de etanol. Una célula eucariota puede ser, sin embargo, adecuada para la producción de productos de fermentación distintos de etanol

Dichos productos de fermentación no etanólica incluyen en principio cualquier producto químico a granel o fino que sea producible por un microorganismo eucariota, tal como una célula eucariota o un hongo filamentosos.

45

Una célula eucariota preferida para la producción de productos de fermentación no etanólicos es una célula hospedadora que contiene una modificación genética que da como resultado la reducida actividad de alcohol deshidrogenasa.

Lignocelulosa

La lignocelulosa, que se puede considerar una posible materia prima renovable, comprende, en general, los polisacáridos celulosa (glucanos) y hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algunas hemicelulosas pueden estar presentes como glucomananos, por ejemplo en materias primas derivadas de la madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos en azúcares solubles, que incluyen tanto monómeros como multímeros, por ejemplo glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas, ocurre bajo la acción de diferentes enzimas que actúan en concierto.

55

Además, las pectinas y otras sustancias pécticas, tales como los arabinanos, pueden constituir una proporción considerable de la masa seca de paredes normalmente celulares de tejidos vegetales no leñosos (aproximadamente de un cuarto a la mitad de la masa seca pueden ser pectinas).

Pretratamiento

5 Antes del tratamiento enzimático, se puede pretratar el material lignocelulósico. El pretratamiento puede comprender exponer el material lignocelulósico a un ácido, una base, un disolvente, calor, un peróxido, ozono, trituración mecánica, pulverización, molienda o despresurización rápida, o una combinación de cualquiera dos o más de los mismos. Este pretratamiento químico se combina frecuentemente con pretratamiento térmico, por ejemplo entre 150-220 °C durante 1 a 30 minutos.

10 Hidrólisis enzimática

El material pretratado se somete comúnmente a hidrólisis enzimática para liberar azúcares que pueden ser fermentados según la invención. Esto se puede ejecutar con métodos convencionales, por ejemplo poniendo en contacto con celulasas, por ejemplo celobiohidrolasa(s), endoglucanasa(s), beta-glucosidasa(s) y opcionalmente otras enzimas. La conversión con las celulasas se puede realizar a temperatura ambiente o a temperaturas más altas, en un tiempo de reacción para liberar cantidades suficientes de azúcar(es). El resultado de las hidrólisis enzimáticas es el producto de hidrólisis que comprende azúcares C5/C6, designados en el presente documento la composición de azúcar.

La composición de azúcar

La composición de azúcar usada según la invención comprende glucosa y una o más pentosas, por ejemplo arabinosa y/o xilosa. Se puede usar cualquier composición de azúcar en la invención que cumpla los criterios. Los azúcares opcionales en la composición de azúcar son galactosa y manosa. En una realización preferida, la composición de azúcar es un hidrolizado de uno o más materiales lignocelulósicos. La lignocelulosa en el presente documento incluye hemicelulosa y partes de hemicelulosa de biomasa. La lignocelulosa también incluye fracciones lignocelulósicas de biomasa. Los materiales lignocelulósicos adecuados se pueden encontrar en la siguiente lista:

20 pisos foliares de huertos frutales, chaparral, desechos de molienda, desechos urbanos de madera, desechos municipales, desechos de explotaciones forestales, aclareos de bosques, cultivos leñosos de rotación corta, desechos industriales, paja de trigo, paja de avena, paja de arroz, paja de cebada, paja de centeno, paja de lino, cáscaras de soja, cáscaras de arroz, paja de arroz, alimentos de gluten de maíz, cáscaras de avena, caña de azúcar, hojas y tallos de maíz, tallos de maíz, mazorcas de maíz, cascarillas de maíz, pasto varilla, miscanto, sorgo dulce, tallos de colza, tallos de soja, pasto de praderas, gamagrass, cola de zorro; pulpa de remolacha azucarera, pulpa de frutas cítricas, cáscaras de semillas, desechos animales celulósicos, recortes de césped, algodón, algas, árboles, madera blanda, madera dura, chopo, pino, arbustos, pastos, trigo, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, maíz, cascarillas de maíz, mazorcas de maíz, grano de maíz, fibra de granos, productos y subproductos de la molienda en húmedo o en seco de granos, residuos sólidos municipales, residuos de papel, restos de jardín, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos municipales, residuos de papel, pulpa, residuos de molienda del papel, ramas, arbustos, cañas de azúcar, maíz, cascarillas de maíz, un cultivo de energía, bosque, un fruto, una flor, un grano, un pasto, un cultivo herbáceo, una hoja, corteza, una aguja, un tronco, una raíz, un árbol joven, un matorral, pasto varilla, un árbol, una verdura, cáscara de fruta, una vid, pulpa de remolacha azucarera, harinillas de trigo, cáscaras de avena, madera dura o blanda, material de desechos orgánicos generados a partir de un proceso agrícola, restos de madera de silvicultura, o una combinación de cualesquiera dos o más de los mismos.

Una visión general de algunas composiciones de azúcar adecuadas derivadas de lignocelulosa y la composición de azúcar de sus hidrolizados se da en la Tabla 15. Las lignocelulosas enumeradas incluyen: mazorcas de maíz, fibra de maíz, cáscaras de arroz, cáscaras de melón, pulpa de remolacha azucarera, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, madera, pasto y prensados de aceitunas.

Tabla 15: Visión general de las composiciones de azúcar de materiales lignocelulósicos. Gal=galactosa, Xil=xilosa, Ara=arabinosa, Man=manosa, Glu=glutamato, Ram=ramnosa. Se da el porcentaje de galactosa (% de Gal) y la fuente bibliográfica.

Material lignocelulósico	Gal	Xil	Ara	Man	Glu	Ram	Suma	% de Gal.
Mazorca de maíz a	10	286	36		227	11	570	1,7
Mazorca de maíz b	131	228	160		144		663	19,8
Cáscaras de arroz a	9	122	24	18	234	10	417	2,2
Cáscaras de arroz b	8	120	28		209	12	378	2,2

Material lignocelulósico	Gal	Xil	Ara	Man	Glu	Ram	Suma	% de Gal.
Cáscaras de melón	6	120	11		208	16	361	1,7
Pulpa de remolacha azucarera	51	17	209	11	211	24	523	9,8
Paja de trigo Idaho	15	249	36		396		696	2,2
Fibra de maíz	36	176	113		372		697	5,2
Bagazo de caña de azúcar	14	180	24	5	391		614	2,3
Hojas y tallos de maíz	19	209	29		370		626	
Taray (madera)	5	118	7	3	493		625	0,7
Eucaliptus (madera)	22	105	8	3	445		583	3,8
CWR (pasto)	8	165	33		340		546	1,4
JTW (pasto)	7	169	28		311		515	1,3
MSW	4	24	5	20	440		493	0,9
Vegetación de pasto alpiste	16	117	30	6	209	1	379	4,2
Semilla de pasto alpiste	13	163	28	6	265	1	476	2,7
Residuos del prensado de aceitunas	15	111	24	8	329		487	3,1

5 Es evidente de la Tabla 15 que en estas lignocelulosas está presente una alta cantidad de azúcar en forma de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa. La conversión de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa en el producto de fermentación es así de gran importancia económica. También está presente manosa en algunos materiales de lignocelulosa, aunque normalmente está en cantidades menores que los azúcares previamente mencionados. Ventajosamente, por tanto, la manosa también se convierte por la célula eucariota.

Se espera que las células eucariotas de la presente invención puedan ser adicionalmente manipuladas para lograr otras características deseables, o incluso mayores rendimientos globales de etanol.

10 La selección de células eucariotas mejoradas sometiendo a pases las células eucariotas sobre medio que contiene hidrolizado ha producido célula eucariota mejorada con tasas de fermentación potenciadas. Usando las enseñanzas de la presente invención, se podrían fácilmente dichas cepas mejoradas.

Por material que contiene pentosa se indica cualquier medio que comprenda pentosa, tanto líquida como sólida. Los materiales que contienen pentosa adecuados incluyen hidrolizados de polisacárido o biomasa lignocelulósica, tales como cascarillas de maíz, madera, papel, subproductos agrícolas, y similares.

15 Por un "hidrolizado", como se usa en el presente documento, se indica un polisacárido que se ha despolimerizado mediante la adición de agua para formar azúcares de mono y oligosacárido. Los hidrolizados se pueden producir por hidrólisis enzimática o ácida del material que contiene polisacárido.

20 Preferentemente, la célula eucariota es capaz de crecer en condiciones similares a las encontradas en fuentes industriales de pentosa. El método de la presente invención sería más económico cuando el material que contiene pentosa se pudiera inocular con la variante de células eucariotas sin excesiva manipulación. A modo de ejemplo, la industria de la pulpa genera grandes cantidades de desechos celulósicos. La sacarificación de la celulosa por hidrólisis ácida da hexosas y pentosas que se pueden usar en reacciones de fermentación. Sin embargo, el hidrolizado o líquido de sulfito contiene altas concentraciones de sulfito e inhibidores fenólicos naturalmente presentes en la madera que inhiben o previenen el crecimiento de la mayoría de los organismos. Los ejemplos a
25 continuación describen la fermentación de pentosa en hidrolizados ácidos (o licor residual de sulfito) de maderas duras y maderas blandas por las células eucariotas de la presente invención. Se espera razonablemente que las cepas de células eucariotas capaces de crecer en líquido residual de sulfito puedan crecer en prácticamente cualquier otro hidrolizado de biomasa.

Propagación

30 La invención se refiere además a un proceso para la propagación aerobia de la célula eucariota consumidora de acetato, en particular la propagación aerobia de la cepa de células eucariotas.

La propagación es en el presente documento cualquier proceso de crecimiento celular eucariota que conduce al aumento de una población de células eucariotas inicial. El principal fin de la propagación es aumentar una población de células eucariotas usando las capacidades de reproducción natural de las células eucariotas como organismos vivos. Puede haber otros motivos para la propagación, por ejemplo, en caso de usar célula eucariota seca, se usa propagación para rehidratar y acondicionar la célula eucariota, antes del cultivo. La célula eucariota fresca, tanto célula eucariota secada activa como torta húmeda, se puede añadir para empezar la propagación directamente.

Las condiciones de propagación son críticas para la producción óptima de células eucariotas y la posterior fermentación, tal como, por ejemplo, fermentación de hidrolizado lignocelulósico en etanol. Incluyen fuente de carbono adecuada, aireación, temperatura y adiciones de nutrientes. El tamaño del tanque para la propagación y es normalmente entre 2 por ciento y 5 por ciento del tamaño del fermentador (hidrolizado lignocelulósico a etanol).

En la propagación, la célula eucariota necesita una fuente de carbono. La fuente de carbono puede comprender en el presente documento glicerol, etanol, acetato y/o azúcares (azúcares C6 y C5). También se pueden usar otras fuentes de carbono. La fuente de carbono se necesita para la biosíntesis de la pared celular y la producción de proteína y energía.

La propagación es un proceso aerobio, así el tanque de propagación debe ser apropiadamente aireado para mantener un cierto nivel de oxígeno disuelto. La aireación adecuada se logra comúnmente por inductores de aire instalados en la tubería que va al tanque de propagación que empuja el aire en la mezcla de propagación a medida que el tanque se llena y durante la recirculación. La capacidad de la mezcla de propagación para retener el oxígeno disuelto es una función de la cantidad de aire añadida y la consistencia de la mezcla, que es por lo que el agua se añade frecuentemente a una relación de entre 50:50 y 90:10 entre pulpa y agua. Las mezclas "densas" de propagación (relación 80:20 entre pulpa y agua y superior) frecuentemente requieren la adición de aire comprimido para compensar la capacidad reducida para retener el oxígeno disuelto. La cantidad de oxígeno disuelto en la mezcla de propagación también es una función del tamaño de burbujas, por lo que algunas plantas de etanol añaden aire a través de burbujeadores que producen burbujas más pequeñas en comparación con inductores de aire. Junto con menor glucosa, la aireación adecuada es importante para promover la respiración aerobia, que se diferencia del entorno de fermentación comparablemente anaerobio. Un signo de aireación inadecuada o altas concentraciones de glucosa es la elevada producción de etanol en el tanque de propagación.

En general, durante la propagación, la célula eucariota requiere una cómoda temperatura para el crecimiento y el metabolismo, por ejemplo la temperatura en el reactor de propagación es entre 25-40 grados Celsius. En general, menores temperaturas dan como resultado metabolismo más lento y reproducción reducida, mientras que temperaturas más altas pueden provocar la producción de compuestos de estrés y reproducción reducida. En una realización, los tanques de propagación están en el interior y protegidos del ataque de las altas temperaturas en verano o las bajas en invierno, de manera que el mantenimiento de las temperaturas óptimas de entre dentro del intervalo de 30-35 °C no es normalmente un problema.

Se puede realizar propagación adicional como normalmente se realiza la propagación de célula eucariota.

Fermentación

La invención se refiere a un proceso para la fermentación de una célula eucariota según la invención, en donde existe un rendimiento mejorado de glicerol, que es ventajoso en la industria vitivinícola. También puede dar como resultado la elevada reducción del nivel de acetato y/o el elevado rendimiento del producto de fermentación, por ejemplo etanol, que es ventajoso en la industria de los bicomcombustibles.

En una realización, la célula eucariota según la invención puede ser una célula eucariota fermentadora de pentosa y glucosa, que incluye, pero no se limita a, dichas células que son capaces de consumo simultáneo anaerobio de pentosa y glucosa. En una realización del proceso, el material que contiene pentosa comprende un hidrolizado de material lignocelulósico. El hidrolizado puede ser un hidrolizado enzimático de material lignocelulósico.

El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aerobio o anaerobio. Un proceso de fermentación anaerobio se define en el presente documento como un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que sustancialmente no se consume oxígeno, preferentemente se consume menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 1 mmol/L/h, más preferentemente 0 mmol/L/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable), y en donde las moléculas orgánicas sirven tanto de donante de electrones como de aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, la NADH producida en la glicólisis y la formación de biomasa no se puede oxidar por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como aceptor de electrones e hidrógeno, regenerando así NAD⁺.

Así, en un proceso de fermentación anaerobio preferido, se usa piruvato como electrón (y aceptor de hidrógeno) y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido y etileno.

El proceso de fermentación se realiza preferentemente a una temperatura que es óptima para la célula. Así, para la mayoría de las células eucariotas o células hospedadoras fúngicas, el proceso de fermentación se realiza a una

temperatura que es inferior a aproximadamente 50 °C, inferior a aproximadamente 42 °C, o inferior a aproximadamente 38 °C. Para célula eucariota o células hospedadoras fúngicas filamentosas, el proceso de fermentación se realiza preferentemente a una temperatura que es inferior a aproximadamente 35, aproximadamente 33, aproximadamente 30 o aproximadamente 28 °C y a una temperatura que es superior a aproximadamente 20, aproximadamente 22, o aproximadamente 25 °C.

El rendimiento del etanol sobre xilosa y/o glucosa en el proceso es preferentemente al menos aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 95 o aproximadamente 98 %. El rendimiento del etanol se define en el presente documento como un porcentaje del rendimiento máximo teórico.

La invención también se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación.

El proceso de fermentación según la presente invención se puede realizar en condiciones aerobias y anaerobias. En una realización, el proceso se lleva a cabo en condiciones micro-aerófilas o de oxígeno limitado.

Un proceso de fermentación anaerobio se define en el presente documento como un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que sustancialmente no se consume oxígeno, preferentemente inferior a aproximadamente 5, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 1 mmol/L/h, y en donde las moléculas orgánicas sirven tanto de donante de electrón como de aceptores de electrones.

Un proceso de fermentación limitado en oxígeno es un proceso en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno desde el gas hasta el líquido. La limitación del grado de oxígeno se determina por la cantidad y la composición del flujo de gas de entrada, así como las actuales propiedades de mezcla/transferencia de masa del equipo de fermentación usado. Preferentemente, en un proceso en condiciones de oxígeno limitado, la tasa de consumo de oxígeno es al menos aproximadamente 5,5, más preferentemente al menos aproximadamente 6, tal como al menos 7 mmol/L/h. Un proceso de la invención puede comprender la recuperación del producto de fermentación.

En un proceso preferido, la célula fermenta tanto la xilosa como la glucosa, preferentemente simultáneamente, en cuyo caso se usa preferentemente una célula que es insensible a la represión de glucosa para prevenir el crecimiento diaúxico. Además de una fuente de xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el componente apropiado requerido para el crecimiento de la célula. Se conocen bien en la técnica las composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos, tales como células eucariotas.

Los procesos de fermentación se pueden llevar a cabo en modo discontinuo, de lotes alimentados, o continuo. Se puede aplicar un proceso separado de hidrólisis y fermentación (SHF) o también un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF). También puede ser posible una combinación de estos procesos de fermentación para productividad óptima. Estos procesos se describen en lo sucesivo con más detalle.

Modo SSF

Para el modo proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF), el tiempo de reacción para la etapa de licuefacción/hidrólisis o presacarificación depende del tiempo para realizar un rendimiento deseado, es decir, rendimiento de la conversión de celulosa en glucosa. Dicho rendimiento es preferentemente tan alto como sea posible, preferentemente 60 % o más, 65 % o más, 70 % o más, 75 % o más 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, 99 % o más, incluso 99,5 % o más o 99,9 % o más.

Según la invención, se realizan concentraciones de azúcar muy altas en el modo SHF y concentraciones muy altas de producto (por ejemplo, etanol) en el modo SSF. En la operación de SHF, la concentración de glucosa es 25 g/L o más, 30 g/L o más, 35 g/L o más, 40 g/L o más, 45 g/L o más, 50 g/L o más, 55 g/L o más, 60 g/L o más, 65 g/L o más, 70 g/L o más, 75 g/L o más, 80 g/L o más, 85 g/L o más, 90 g/L o más, 95 g/L o más, 100 g/L o más, 110 g/L o más, 120 g/L o más, o puede ser, por ejemplo, 25 g/L-250 g/L, 30 g/L-200 g/L, 40 g/L-200 g/L, 50 g/L-200 g/L, 60 g/L-200 g/L, 70 g/L-200 g/L, 80 g/L-200 g/L, 90 g/L-200 g/L.

Concentración de producto en modo SSF

En la operación SSF, la concentración de producto (g/L) depende de la cantidad de glucosa producida, pero ésta no es visible puesto que los azúcares se convierten en producto en SSF, y se pueden relacionar concentraciones de producto con la concentración de glucosa subyacente por multiplicación con el rendimiento máximo teórico (Yps máx en g de producto por gramo de glucosa)

El rendimiento máximo teórico (Yps máx en g de producto por gramo de glucosa) de un producto de fermentación se puede derivar de la bioquímica de libros de texto. Para etanol, 1 mol de glucosa (180 gr) da según la vía de fermentación de glicólisis normal en la célula eucariota 2 moles de etanol (=2x46 = 92 g de etanol). El rendimiento máximo teórico de etanol en glucosa es, por tanto, 92/180 = 0,511 g de etanol/g de glucosa.

Para butanol (MW 74 g/mol) o isobutanol, el rendimiento máximo teórico es 1 mol de butanol por mol de glucosa. Así, Yps máx para (iso)butanol = $74/180 = 0,411$ g de (iso)butanol/g de glucosa.

Para ácido láctico, el rendimiento de fermentación para la fermentación homoláctica es 2 moles de ácido láctico (MW = 90 g/mol) por mol de glucosa. Según esta estequiometría, Yps máx = 1 g de ácido láctico/g de glucosa.

- 5 Se puede un cálculo similar para fermentaciones de C5/C6, en las que además de glucosa también se incluyen pentosas, por ejemplo, xilosa y/o arabinosa.

Para otros productos de fermentación se puede hacer un cálculo similar.

Modo SSF

- 10 En la operación SSF, la concentración de producto es 25 g * Yps g/L /L o más, 30 * Yps g/L o más, 35 g * Yps /L o más, 40 * Yps g/L o más, 45 * Yps g/L o más, 50 * Yps g/L o más, 55 * Yps g/L o más, 60 * Yps g/L o más, 65 * Yps g/L o más, 70 * Yps g/L o más, 75 * Yps g/L o más, 80 * Yps g/L o más, 85 * Yps g/L o más, 90 * Yps g/L o más, 95 * Yps g/L o más, 100 * Yps g/L o más, 110 * Yps g/L o más, 120 g/L * Yps o más, o puede ser, por ejemplo, 25 * Yps g/L-250 * Yps g/L, 30 * Yps g/L-200 * Yps g/L, 40 * Yps g/L-200 * Yps g/L, 50 * Yps g/L-200 * Yps g/L, 60 * Yps g/L-200 * Yps g/L, 70 * Yps g/L-200 * Yps g/L, 80 * Yps g/L-200 * Yps g/L, 90 * Yps g/L , 80 * Yps g/L-200 * Yps g/L

Por consiguiente, la invención proporciona un método de preparación de un producto de fermentación, método que comprende:

- a. degradar lignocelulosa usando un método como se describe en el presente documento; y
- b. fermentar el material resultante,

- 20 así para preparar un producto de fermentación.

Producto de fermentación

- 25 El producto de fermentación de la invención puede ser cualquier producto útil. En una realización, es un producto seleccionado del grupo que consiste en etanol, n-butanol, 2-butanol, isobutanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ácido itacónico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido adípico, un aminoácido, tal como lisina, metionina, triptófano, treonina y ácido aspártico, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, un antibiótico β -lactámico y una cefalosporina, vitaminas, productos farmacéuticos, suplementos para piensos animales, productos químicos de especialidad, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles, que incluyen biocombustibles y biogás o polímeros orgánicos, y una enzima industrial, tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidoreductasa, una transferasa o una xilanas.

Recuperación del producto de fermentación

- 35 Para la recuperación del producto de fermentación se usan tecnologías existentes. Para diferentes productos de fermentación, son apropiados diferentes procesos de recuperación. Los métodos de recuperación existentes de etanol de mezclas acuosas usan comúnmente técnicas de fraccionamiento y adsorción. Por ejemplo, aún se puede usar una cerveza para procesar un producto fermentado, que contiene etanol en una mezcla acuosa, para producir una mezcla enriquecida que contiene etanol que luego se somete a fraccionamiento (por ejemplo, destilación fraccionada u otras técnicas similares). A continuación, las fracciones que contienen las concentraciones de etanol más altas se pueden pasar a través de un adsorbente para retirar casi todo, si no todo, el agua restante del etanol. En una realización, además de la recuperación del producto de fermentación, se puede recircular la levadura.

- 40 Los siguientes ejemplos no limitantes pretenden ser puramente ilustrativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

1. Materiales y métodos

1.1. Cepas y mantenimiento

- 45 Todas las cepas de *S. cerevisiae* usadas en esta solicitud (Tabla 16) se basan en el linaje GEN.PK (van Dijken et al. 2000). Se propagaron cultivos madre de *S. cerevisiae* en medio sintético (Verduyn et al. 1992), o medio YP (10 g de L⁻¹ de extracto de levadura Bacto, 20 g L⁻¹ de peptona Bacto). Se complementaron 20 g L⁻¹ de glucosa como fuente de carbono en el medio anteriormente. Se propagaron cultivos madre de *DH5a* de *E. coli* en medio LB (10 g L⁻¹ de triptona Bacto, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura Bacto, 5 g L⁻¹ de NaCl), complementado con 100 μ g mL⁻¹ de

ampicilina o 50 µg mL⁻¹ de kanamicina. Se almacenaron disoluciones madre congeladas de cepas a -80 °C, después de la adición de 30 % v/v de glicerol a cultivos de fase estacionaria.

Tabla 16. Cepas de *S. cerevisiae* usadas en este estudio.

Nombre de cepa	Genotipo relevante	Origen
CEN.PK113-7D	<i>MATa MAL2-8^c SUC2</i>	P. Kötter
IMX585	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2</i>	Maris et al. 2015
IMK643	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gnd2Δ</i>	Presente solicitud
IMX705	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gnd2Δ gnd1::gndA</i>	Presente solicitud
IMX706	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gnd2Δ gnd1::6pgdh</i>	Presente solicitud
IMX707	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gnd2Δ gnd1::gox1705</i>	Presente solicitud
IMX756	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gnd2Δ gnd1::gndA ald6Δ</i>	Presente solicitud
IMX817	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gnd2Δ gnd1::gndA ald6Δ gpd2::eutE</i>	Presente solicitud
IMX860	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gnd2Δ gnd1::gndA ald6Δ gpd2::eutE gpd1Δ</i>	Presente solicitud
IMX883	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gpd2::eutE</i>	Presente solicitud
IMX888	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 gpd2::eutE gpd1Δ</i>	Presente solicitud
IMX899	<i>MATa MAL2-8c SUC2 can1::cas9-natNT2 ald6Δ</i>	Presente solicitud

5 1.2. Construcción de plásmidos y casetes

Se realizaron modificaciones genéticas de levadura usando el sistema editor del genoma quimérico CRISPR/Cas9 (DiCarlo et al. 2013). Se usó el plásmido pMEL11 (Mans et al. 2015) para deleciones individuales de *GND1*, *GND2* y *ALD6*. Se usó el plásmido pROS11 (Mans et al. 2015) para deleciones individuales de *GPD1* y *GPD2*. Se identificaron secuencias diana de CRISPR/Cas9 únicas en cada gen basándose en la lista de secuencias proporcionada por (DiCarlo et al. 2013). Los cebadores que se usan en el presente documento son SEQ ID NO: 10-46, con sus N° de cebador dados. Se amplificaron por PCR el esqueleto de plásmido de pMEL11 y pROS11 usando las combinaciones de cebadores 5792-5980 y 5793-5793, respectivamente (Sigma-Aldrich). Se obtuvieron por PCR secuencias de inserción de plásmidos, que expresan la secuencia de direccionamiento de ARNg de 20 pb, con las combinaciones de cebadores 5979-7365 para *GND1*, 5979-7231 para *GND2* y 5979-7610 para *ALD6* usando pMEL11 como molde. Se obtuvieron por PCR secuencias de inserción que expresan las secuencias de ARNg que se dirigen a *GPD1* y *GPD2* usando las combinaciones de cebadores 6965-6965 y 6966-6966, respectivamente, con pROS11 como molde. Se realizaron las amplificaciones por PCR para la construcción de todos los plásmidos y casetes usando ADN polimerasa Phusion® Hot Start II High Fidelity (Thermo Scientific, Waltham, MA), según las pautas del fabricante. En los casos en los que los plásmidos se ensamblaron previamente, se usó el kit de clonación Gibson Assembly® (New England Biolabs, MA); las reacciones se realizaron según el protocolo del proveedor (disminución de escala a 10 µL). Se permitió el ensamblaje por secuencias homólogas en los extremos 5' y 3' de los fragmentos de PCR generados. El ensamblaje del esqueleto de pMEL11 y las secuencias de inserción que codifican los ARNg que se dirigen a *GND1* y *GND2* dieron los plásmidos pUDR122 y pUDR123, respectivamente. En cada caso, se usó 1 µL de la mezcla de Gibson Assembly para la electroporación de células *DH5a* de *E. coli* en un sistema de electroporación Gene PulserXcell (Biorad). Los plásmidos se volvieron a aislar de cultivos de *E. coli* usando un kit de plásmidos Sigma GenElute (Sigma-Aldrich). La validación de los plásmidos se realizó por PCR de diagnóstico (Dreamtaq®, Thermo Scientific) o análisis de restricción. Se puede encontrar una lista completa de todos los plásmidos en la Tabla 17. No se ensamblaron previamente los plásmidos que expresan ARNg de *ALD6*, *GPD1* y *GPD2*; el esqueleto y los fragmentos de inserción se transformaron directamente en levadura y los plásmidos se ensamblaron *in vivo* en cada caso.

Se optimizaron en los codones las secuencias de *Methylobacillus flagellatus* KT *gndA* (AF167580_1), *Gluconobacter oxidans* 621H *gox1705* (AAW61445.1) y *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 *6pgdh* basándose en la composición de codones de genes glicolíticos altamente expresados. En el caso de *B. japonicum*, la secuencia de *6pgdh* se obtuvo alineando su secuencia genómica traducida (NC_004463.1) con las otras dos proteínas (45 % y 57 % de

- similitud, respectivamente). Se flanquearon los casetes de integración de levadura de los genes anteriores por el promotor de *TPI1* y el terminador de *CYC1*. Se sintetizaron los casetes completos, que incluyen promotor, gen y secuencias terminadoras, por GeneArt GmbH (Regensburg, Alemania) y se suministraron en vectores pMK-RQ (GeneArt). Después de la clonación en *E. coli*, los plásmidos se volvieron a aislar y se usaron como moldes para la amplificación por PCR de los casetes de integración. Los casetes de integración *TPI1p-gndA-CYC1t*, *TPI1p-6pgdH-CYC1t* y *TPI1p-gox1705-CYC1t* se obtuvieron por PCR usando la combinación de cebadores 7380-7381 y los plásmidos pMK-RQ-gndA, pMK-RQ-6pgdH y pMK-RQ-gox1705, respectivamente, como moldes. Para la proteína gox1705, K_m NADP⁺ es 440 μ M y K_m NAD⁺ es 64 μ M, de manera que la relación K_m NADP⁺ / K_m NAD⁺ = 6,88. La proteína gox1705 es dependiente de NAD⁺.
- Se obtuvo *eutE* optimizado en el par de codones de *S. cerevisiae* a partir de pBOL199 por corte con restricción *XhoI/SpeI* y se ligó en pAG426GPD-ccdB (Addgene, Cambridge, MA), dando el plásmido de múltiples copias pUDE197. Para la preparación de casetes de integración se usó un pRS406 cortado con *SacI/EagI* (Addgene, Cambridge, MA) como esqueleto de plásmido y se ligó con el casete de *TDH3p-eutE-CYC1t* obtenido por el mismo patrón de restricción de pUDE197, dando el plásmido pUDI076.
- El casete de integración *TDH3p-eutE-CYC1t* se obtuvo usando la combinación de cebadores 7991-7992 y el plásmido pUDI076 como molde. Los cebadores anteriores se diseñaron para añadir 60 pb de secuencia de ADN en los extremos 5' y 3' de los productos de PCR, correspondientes a las secuencias directamente en la dirección 5' y en la dirección 3' del marco de lectura abierto de los loci dirigidos en el genoma de *S. cerevisiae*. Se dirigieron los casetes que expresan *TPI1p-gndA-CYC1t*, *TPI1p-6pgdH-CYC1t* y *TPI1p-gox1705-CYC1t* al locus de *GND1* y se dirigió el casete *TDH3p-eutE-CYC1t* al locus de *GPD2*.

Tabla 17. Plásmidos usados en este estudio.

Nombre	Características	Origen
pBOL199	Vector de administración, p426- <i>TDH3p-eutE</i>	(Müller et al. 2010)
pMEL11	2 μ m ori, <i>amdS</i> , <i>SNR52p</i> -gRNA. <i>CAN1.Y-SUP4t</i>	(Mans et al. 2015)
pROS11	AmdSYM-gRNA. <i>CAN1</i> -2mu-gRNA. <i>ADE2</i>	(Mans et al. 2015)
pUDE197	2 μ m ori, p426- <i>TDH3p-eutE-CYC1t</i>	Presente solicitud
pUDI076	pRS406- <i>TDH3p-eutE-CYC1t</i>	Presente solicitud
pUDR122	2 μ m ori, <i>amdS</i> , <i>SNR52p</i> -gRNA. <i>GND2.Y-SUP4t</i>	Presente solicitud
pUDR123	2 μ m ori, <i>amdS</i> , <i>SNR52p</i> -gRNA. <i>GND1.Y-SUP4t</i>	Presente solicitud
pMK-RQ- <i>gndA</i>	Vector de administración, <i>TPI1p-gndA-CYC1t</i>	GeneArt, Alemania
pMK-RQ- <i>6pgdH</i>	Vector de administración, <i>TPI1p-6pgdH-CYC1t</i>	GeneArt, Alemania
pMK-RQ- <i>gox1705</i>	Vector de administración, <i>TPI1p-gox1705-CYC1t</i>	GeneArt, Alemania

1.3. Construcción de cepas

- Se realizaron transformaciones de levadura usando el método de acetato de litio (Gietz y Woods, 2002). La selección de mutantes se realizó sobre placas de medio agar sintético (2 % de Agar Bacto, Difco) (Verduyn et al. 1992) complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa y con acetamida como la única fuente de nitrógeno, como se describe en (Solis-Escalante et al. 2013). En cada caso, se realizó la confirmación de integraciones satisfactorias por PCR de diagnóstico usando combinaciones de cebadores que se unen fuera de los loci dirigidos, así como dentro de los ORFs de los casetes integrados. Se ejecutó el reciclado de plásmidos después de la transformación como se describe en (Solis-Escalante et al. 2013).
- Se obtuvo la cepa IMK643 por inactivación de *GND2* basada en CRISPR/Cas9 sin marcadores por co-transformación del ARNg que expresa el plásmido pUDR123 y los oligonucleótidos de reparación 7299-7300. Los casetes de integración *TPI1p-gndA-CYC1t*, *TPI1p-6pgdH-CYC1t* y *TPI1p-gox1705-CYC1t* se transformaron en IMK643, junto con el ARNg que expresa el plásmido pUDR122, dando las cepas IMX705, IMX706 e IMX707, respectivamente. La co-transformación del esqueleto de pMEL11, el ARNg que se dirige a *ALD6* que expresa la inserción de plásmido y los oligonucleótidos de reparación 7608-7609 en las cepas IMX705 e IMX585 dio las cepas IMX756 e IMX899, respectivamente, en las que *ALD6* se delecionó sin integración de un marcador. La co-transformación del esqueleto de pROS11, el ARNg que se dirige a *GPD2* que expresa la inserción de plásmido y el casete de integración *TDH3p-eutE-CYC1t* en cepas IMX756 e IMX585 dio las cepas IMX817 e IMX883, respectivamente. La delección sin marcador de *GPD1* en cepas IMX817 e IMX883 se realizó por co-transformación

del esqueleto de pROS11, el ARNg que se dirige a *GPD1* que expresa la inserción de plásmido y los oligonucleótidos de reparación 6967-6968, dando las cepas IMX860 e IMX888, respectivamente.

1.4. Cultivo y medios

Se realizaron cultivos aerobios en matraz oscilante en matraces de 500 mL que contenían 100 mL de medio mínimo sintético (Verduyn et al. 1992), complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa. El valor de pH se ajustó a 6 mediante la adición de KOH 2 M antes de la esterilización por autoclave a 120 °C durante 20 min. Se esterilizaron en autoclave por separado a 110 °C durante 20 min disoluciones de glucosa y se añadieron a los matraces estériles. Se esterilizaron por filtración disoluciones de vitamina y se añadieron a los matraces estériles por separado. Los cultivos se cultivaron a 30 °C y 200 rpm. Se inocularon matraces oscilantes de pre-cultivo iniciales de disoluciones madre congeladas en cada caso. Después de 8-12 h, se inocularon matraces de pre-cultivo nuevos a partir de los matraces iniciales. Los cultivos preparados de esta forma se usaron en experimentos de matraz oscilante aerobio o como inóculo para fermentaciones anaerobias. Los biorreactores se inocularon hasta un valor de DO de 0,2-0,3 a partir de matraces de pre-cultivo exponencialmente en crecimiento. Las fermentaciones de lotes anaerobios se realizaron en el biorreactor Applikon de 2 L (Applikon, Schiedam, NL), con un volumen de trabajo de 1 L. Todas las fermentaciones discontinuas anaerobias se realizaron en medio mínimo sintético (20 g L⁻¹ de glucosa), preparado de la misma forma que los medios de matraz. Los medios de crecimiento anaerobios se complementaron adicionalmente con 0,2 g L⁻¹ de antiespumante C estéril (Sigma-Aldrich), ergosterol (10 mg L⁻¹) y Tween 80 (420 mg L⁻¹), añadidos por separado. Las fermentaciones se realizaron a 30 °C y se agitaron a 800 rpm. Se usó gas nitrógeno (<10 ppm de oxígeno) para el burbujeo (0,5 L min⁻¹). El pH de fermentación se mantuvo a 5 por adición automática de KOH 2 M. Los biorreactores se equiparon con tuberías Nonprene y juntas tóricas Viton para minimizar la difusión de oxígeno en el medio. Todas las fermentaciones se realizaron por duplicado.

1.5. Métodos analíticos

Se hizo la determinación de la densidad óptica a 660 nm usando un espectrofotómetro Libra S11 (Biochrom, Cambridge, R. U.). El análisis de los gases de salida, mediciones de peso seco y análisis de HPLC de sobrenadante de cultivo, que incluyen correcciones para la evaporación de etanol, se realizaron como se describe en (Medina et al. 2010).

1.6. Determinación de la actividad enzimática

Se realizó la preparación de extractos sin células para la determinación *in vitro* de actividades enzimáticas como se describió previamente (Kozak et al. 2014). Los ensayos se realizaron a 30 °C; la actividad enzimática se midió monitorizando la reducción de NAD⁺/NADP⁺ (para 6PGDH) u oxidación de NADH a 340 nm (para EutE). La mezcla del ensayo de actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa unida a NADP⁺ contuvo Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), 5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de NADP⁺ y 50 o 100 µL de extracto de células en un volumen total de 1 mL. La reacción se empezó mediante la adición de 5 mM de glucosa-6-fosfato. La mezcla del ensayo de actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa unida a NAD⁺ / NADP⁺ contuvo Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), 5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de NAD⁺ / NADP⁺, respectivamente, y 50 o 100 µL de extracto de células en un volumen total de 1 mL. Las reacciones empezaron mediante la adición de 5 mM de 6-fosfogluconato. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y las velocidades de reacción fueron proporcionales a la cantidad de extracto de células añadidas.

1.7 Expresión de una 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ heteróloga

Para cambiar la especificidad del cofactor de 6-fosfogluconato deshidrogenasa de NADP⁺ a NAD⁺, se delecionaron *GND1* y *GND2*, que codifican la isoforma principal y la secundaria de la enzima en *S. cerevisiae*, respectivamente. Se optimizaron en los codones genes heterólogos que codifican enzimas dependientes de NAD⁺ (*M. flagellatus* y *B. japonicum*) o preferentes de NAD⁺ (*G. oxidans*) para la expresión en *S. cerevisiae* y se integraron en el sitio de *GND1*, con el control del promotor constitutivo fuerte de *TP11*. Los experimentos de crecimiento realizados en matraces oscilantes de medio sintético aerobio (20 g L⁻¹ de glucosa) con las capas manipuladas no indicaron un efecto significativo de la expresión en exceso de los genes heterólogos sobre la máxima velocidad de crecimiento en comparación con la cepa parental IMX585 (la velocidad de crecimiento fue aproximadamente 95 % de la cepa parental), con la excepción de IMX706, que expresa la enzima de *B. japonicum* (Tabla 18).

Tabla 18. Velocidades de crecimiento específicas promedio (µ) obtenidas en matraces oscilantes de medio sintético aerobio (pH 6) que contienen 20 g L⁻¹ de glucosa (los experimentos se realizaron por duplicado, se indican las desviaciones medias de duplicados), 30 °C, 200 rpm.

Cepa	Genotipo relevante	Promedio µ (h ⁻¹)
IMX585	<i>GND1 GND2</i>	0,38 ± 0,01
IMX705	<i>gnd2Δ gnd1::gndA</i>	0,36 ± 0,00
IMX706	<i>gnd2Δ gnd1::6pgdh</i>	0,28 ± 0,01
IMX707	<i>gnd2Δ gnd1::gox1705</i>	0,36 ± 0,00

Para investigar la expresión funcional de las enzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa heteróloga en *S. cerevisiae*, se realizaron ensayos enzimáticos en extractos sin células, preparados a partir de cultivos aerobios de crecimiento exponencial en matraz oscilante de las cepas manipuladas (recogidas a DO 4-5). Los ensayos se realizaron para la cuantificación de actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, así como actividades de 6-fosfogluconato deshidrogenasas dependientes de NAD⁺ y NADP⁺. Se realizó la determinación de actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como una comprobación de calidad de los extractos sin células, las determinaciones de actividad enzimática demostraron glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa funcional en todas las cepas generadas (Figura 1). Todas las cepas manipuladas mostraron actividades de 6PGDH dependiente de NAD⁺ altas y de NADP⁺ residuales bajas, en línea con la expresión funcional esperada de las enzimas heterólogas y la delección de *GND1* y *GND2*. La cepa IMX705, que expresa *gndA* de *Methylobacillus flagellatus*, mostró la actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ más alta *in vitro* ($0,49 \pm 0,1 \mu\text{mol mg de biomasa}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Además, todas las cepas manipuladas mostraron un aumento significativo en la relación de actividades de 6-fosfogluconato deshidrogenasa unida a NAD⁺/NADP⁺ cuando se comparó con la cepa de control IMX585 (Tabla 18). Además de la actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ *in vitro* más alta, la cepa IMX705 también mostró la relación más alta de todas las cepas manipuladas (46 ± 10).

Tabla 18A. Relaciones de actividades de 6-fosfogluconato deshidrogenasa específica unida a NAD⁺/NADP⁺ de extractos sin células de cultivos de crecimiento exponencial en matraz oscilante, recogidas a DO = 4 a 5. Los cultivos se cultivaron en medio sintético complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa, pH 6, 30 °C, 200 rpm. Datos de experimentos duplicados independientes, las barras de error indican desviaciones medias de los duplicados.

Cepa	Genotipo relevante	Relación de actividad unida a NAD ⁺ /NADP ⁺
IMX585	<i>GND1 GND2</i>	<0,01
IMX705	<i>gnd2Δ gnd1::gndA</i>	46 ± 10
IMX706	<i>gnd2Δ gnd1::6pgdh</i>	5 ± 0,2
IMX707	<i>gnd2Δ gnd1::gox1705</i>	11 ± 0,5

Los resultados del ensayo enzimático indicaron hacia la cepa que expresa *gndA* que es la cepa que rinde mejor; por este motivo, se caracterizó adicionalmente IMX705.

1.8 Experimentos discontinuos anaerobios

Los resultados de los ensayos enzimáticos indicaron hacia un cambio de especificidad de cofactor satisfactorio de 6-fosfogluconato deshidrogenasa de NADP⁺ a NAD⁺.

Para investigar el efecto del cambio de especificidad de cofactor de 6-fosfogluconato deshidrogenasa sobre la fisiología anaerobia de *S. cerevisiae*, se realizaron experimentos discontinuos anaerobios en biorreactores. Se cultivaron cepas IMX585 (*GND1 GND2*) e IMX705 (*gnd2Δ gnd1::gndA*) en medio sintético complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa. La velocidad de crecimiento de la cepa manipulada IMX705 fue similar a la cepa de referencia (aproximadamente 95 % de IMX585 (Tabla 19)). Además, fueron comparables los perfiles de consumo de azúcar, siendo la glucosa agotada después de aproximadamente 12 horas (Figura 2). El lote anaerobio con la cepa IMX705 produjo un elevado rendimiento de glicerol del 19,8 % en glucosa en comparación con IMX585 (Tabla 19). Además, la cantidad de glicerol formada por biomasa en la fermentación con la cepa IMX705 fue 24,1 % superior a aquella con la cepa IMX585.

En las fermentaciones anaerobias de la cepa IMX705, se observó un aumento de aproximadamente 9 % en la producción de acetato extracelular por biomasa formada, en comparación con la cepa de referencia IMX585 (Tabla 19). El aumento en acetato extracelular podría haber sido un resultado de la regulación por incremento de la aldehído deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ citosólica que cataliza la reacción acetaldehído + NADP⁺ → acetato + NADPH + H⁺, codificada por *ALD6*. Junto con la rama oxidativa de la vía de la pentosa-fosfato, Ald6p proporciona otra vía importante para la regeneración de NADPH en el citosol de las células. Se ha demostrado que la expresión en exceso de *ALD6* en una cepa *zwf1Δ* da como resultado elevadas velocidades de crecimiento en glucosa; además, no son viables los mutantes dobles *zwf1Δ ald6Δ*. Además, en un escenario donde la vía de formación de glicerol en la cepa IMX705 se ha sustituido por la reducción de acetato, Ald6p puede interferir con la generación de NADH adicional en el citosol, participando en un ciclo de tipo transhidrogenasa conducido por ATP en el citosol (Figura 3). En este ciclo, 1 mol de acetato se convierte en 1 mol de acetyl-CoA mediante la reacción catalizada por Acs1p y Acs2p, al coste neto de 2 moles de ATP. El 1 mol de acetyl-CoA se reduce entonces en 1 mol de acetaldehído mediante la reacción catalizada por acetaldehído deshidrogenasa acetilante, con una oxidación concomitante de 1 mol de NADH a NAD⁺. El 1 mol de acetaldehído se puede entonces oxidar de nuevo en 1 mol de acetato mediante Ald6p, con una reducción concomitante de 1 mol de NADP⁺ a NADPH. De esta forma, ambos cofactores se pueden regenerar a costa de ATP. La retirada de la reacción catalizada por Ald6p previene que este posible ciclo tenga lugar.

En las cepas no mutantes, la reacción catalizada por Ald6p es importante para la generación de NADPH, así como la formación de acetato, que es un precursor de acetil-CoA. En la cepa de *ald6Δ* IMX756, se puede formar posiblemente acetato mediante las reacciones catalizadas por Ald2p y Ald3p citosólicos por las isoformas Ald4p y Ald5p mitocondriales. Ald2p y Ald3p son dependientes de NAD⁺ y la formación de acetato requerida para el crecimiento mediante las reacciones catalizadas por estas enzimas resultará probablemente en la formación adicional de NADH citosólico. Ald4p puede utilizar tanto NAD⁺ como NADP⁺ como cofactores. Los cofactores de nicotinamida no pueden, en general, cruzar la membrana mitocondrial interna. En cultivos anaeróbicamente cultivados de *S. cerevisiae*, la re-oxidación de NADH producida por la formación de acetato catalizada por Ald4p requeriría la transferencia de reducir equivalentes a través de la membrana mitocondrial. Esto se podría llevar a cabo, por ejemplo, mediante sistemas lanzadera mitocondriales, tales como la lanzadera de acetaldehído-etanol, cuya transferencia reduce los equivalentes a NAD⁺ citosólico. El exceso de NADH citosólico se puede re-oxidar entonces mediante la elevada formación de glicerol.

Para retirar la vía de regeneración alternativa de NADPH catalizada por Ald6p, se deletionó *ALD6* en la cepa IMX705 dando la cepa IMX756. Los presentes inventores han encontrado una delección de *ALD6* que es posiblemente beneficiosa para la generación de una cepa que consume acetato, ya que puede retirar una posible reacción de tipo transhidrogenasa conducida por ATP en el citoplasma de las células, creada por Acs1p / Acs2p, EutEp y Ald6p (Figura 4). Para investigar el efecto de Ald6p sobre la fisiología anaerobia de *S. cerevisiae* no mutante, *ALD6* también se deletionó en la cepa IMX585 dando la cepa IMX899.

Las cepas IMX899 e IMX756 se caracterizaron en experimentos discontinuos anaerobios, en las mismas condiciones que los lotes realizados con las cepas IMX585 e IMX705. Las velocidades de crecimiento de IMX899 e IMX756 fueron aproximadamente 90 % y 81 % de la velocidad de crecimiento de la cepa de referencia IMX585. La formación de acetato extracelular fue gravemente afectada en las fases tempranas de las fermentaciones, y su concentración disminuyó hasta por debajo de los niveles de detección en las etapas posteriores (datos no mostrados) en fermentaciones con ambas cepas. El lote anaerobio con la cepa IMX899 produjo un aumento de 1 % en el rendimiento de glicerol en glucosa y de 5,3 % en el glicerol formado por la biomasa en comparación con la cepa de referencia IMX585 (Tabla 19A), que indica un efecto menor de la delección en la generación de NADH citosólico adicional. Sin embargo, la fermentación con la cepa IMX756, en la que la delección de *ALD6* se combinó con la expresión en exceso de *gndA* y las delecciones de *GND1* y *GND2*, produjo un aumento de 39 % en el rendimiento de glicerol en glucosa y de 55 % en el glicerol formado por la biomasa formada en comparación con la cepa de referencia IMX585 (Tabla 19A).

Este estudio proporciona prueba del principio de que diferentes 6-fosfogluconato deshidrogenasas dependientes de NAD⁺ heterólogas pueden ser funcionalmente expresadas en *S. cerevisiae*. Además, la expresión en exceso de *gndA* en una cepa *gnd1Δ gnd2Δ* produjo un aumento en la formación de glicerol por biomasa formada, que indica un aumento en la formación de NADH citosólica por biomasa formada. La delección adicional de *ALD6* en la cepa IMX705 mostró un marcado aumento en el rendimiento de glicerol en glucosa, así como la formación de glicerol por biomasa formada en cultivos anaerobios de la cepa mutante en comparación con el control. Las estrategias de manipulación causaron solo una disminución menor en las máximas velocidades de crecimiento específicas de las cepas mutantes. Esto indica que esta estrategia podría ser directamente aplicada a cepas industriales y ser usada posiblemente para aumentar el consumo de ácido acético en hidrolizados.

Tabla 19. Máximas velocidades de crecimiento específicas (μ), rendimientos de productos principales y relaciones entre la formación de glicerol y acetato por biomasa formada. Datos obtenidos a partir de las fermentaciones discontinuas anaerobias realizadas en birreactores, con las cepas IMX585, IMX705, IMX899 e IMX756. Las fermentaciones se realizaron en medio sintético complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa. Los lotes se realizaron a pH 5, burbujeo de 500 mL min⁻¹ de N₂, 30 °C. Los rendimientos y las relaciones se calcularon a partir de los datos recogidos en la fase de crecimiento exponencial, como las pendientes de los gráficos de los valores medidos. El cálculo de los rendimientos de etanol se basó en datos corregidos para la evaporación. Los datos se presentan como promedios de experimentos duplicados independientes.

Cepa	IMX585	IMX705	IMX756
μ (h ⁻¹)	0,32 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Y glicerol/glucosa (g/g)	0,106 ± 0,001	0,130 ± 0,002	0,144 ± 0,001
Y biomasa/glucosa (g/g)	0,094 ± 0,004	0,087 ± 0,002	0,083 ± 0,002
Y EtOH/glucosa (g/g)	0,360 ± 0,01	0,368 ± 0,01	0,363 ± 0,02
Relación glicerol formado/biomasa (g/g)	1,123 ± 0,04	1,394 ± 0,02	1,752 ± 0,05
Relación acetato formado/biomasa (g/g)	0,090 ± 0,002	0,098 ± 0,001	Por debajo del límite de detección

Considerando en el cálculo la evaporación del etanol, con mmoles en lugar de g para los cálculos de relación, y los datos de adición para IMX899, los datos se dan en la Tabla 19A:

Tabla 19A

Cepa	IMX585	IMX705	IMX899	IMX756
μ (h ⁻¹)	0,32 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Y glicerol/glucosa (g g ⁻¹)	0,105 ± 0,000	0,121 ± 0,001	0,106 ± 0,000	0,146 ± 0,000
Y biomasa/glucosa (g _x g ⁻¹)	0,094 ± 0,004	0,087 ± 0,002	0,088 ± 0,001	0,083 ± 0,002
Y EtOH/glucosa (g g ⁻¹)	0,372 ± 0,001	0,379 ± 0,001	0,386 ± 0,000	0,374 ± 0,002
Relación glicerol formado/biomasa (mmol g _x ⁻¹)	12,19 ± 0,44	15,14 ± 0,22	12,83 ± 0,39	18,90 ± 0,56
Relación acetato formado/biomasa (mmol g _x ⁻¹)	1,50 ± 0,03	1,63 ± 0,02	<0,05	<0,05

Ejemplo 2

5 2.1 Cambio de especificidad del cofactor de 6PGDH en combinación con la vía reductora de acetato

El cambio combinado de la especificidad del cofactor de 6-fosfogluconato deshidrogenasa de NADP⁺ a NAD⁺ y la delección de *ALD6* en la cepa IMX756 produjo un aumento de 37,7 % en el rendimiento de glicerol en glucosa en comparación con la cepa de control IMX585 en fermentaciones discontinuas anaerobias. Este resultado estuvo en línea con el aumento de 40,5 % estimado en el rendimiento de glicerol en glucosa, en el escenario donde se genera NADH en exceso en el citosol basándose en la estrategia propuesta y la vía de formación de glicerol está todavía intacta. Como la siguiente etapa, se investiga el efecto de la sustitución de la vía de formación de glicerol por la reductora de acetato sobre la cantidad de acetato que se puede consumir por una cepa con IMX756 como parental.

Para sustituir la vía de formación de glicerol por la de reducción de acetato, se deleccionaron *GPD1* y *GPD2* (que codifican glicerol-3-fosfato deshidrogenasas) y se expresó en exceso *eutE* (codificado por acetaldehído deshidrogenasa acetilante de *E. coli*) en la cepa IMX756, dando la cepa IMX860. Además, la delección de *GPD1* y *GPD2* y la expresión en exceso de *eutE* en IMX585 dio la cepa de control reductora de acetato IMX888.

En la cepa reductora de acetato IMX888, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa es dependiente de NADP⁺. Basándose en los análisis teóricos realizados en el presente documento, se espera un consumo de 5,51 mmoles de acetato por gramo de biomasa formada para esta cepa, en fermentaciones anaerobias con glucosa como fuente de carbono. En la cepa IMX860, en la que cambia la especificidad del cofactor, se espera un consumo de 8,75 mmoles de acetato por gramo de biomasa formada.

En este experimento, se investiga el efecto de la estrategia de manipulación propuesta en este escenario en el consumo de acetato anaerobio. Se cultivaron las cepas IMX860 e IMX888 en fermentaciones anaerobias en birreactores, complementados con 20 g L⁻¹ de glucosa y 3 g L⁻¹ de ácido acético. El burbujeo, control del pH, así como temperatura, fueron idénticos a los lotes realizados con las cepas IMX585, IMX705 e IMX756. Basándose en el análisis teórico, se espera un aumento de 59 % en acetato consumido por biomasa formada en la cepa IMX860 en comparación con IMX888. Además, la estrategia de manipulación en la cepa IMX860 debe dar como resultado un aumento teórico de 3 % en el rendimiento del etanol en glucosa en comparación con la cepa IMX888 y 22,4 % en comparación con el escenario no mutante. Los resultados se dan en las Tablas 20, 20A y 21. Para la Tabla 20A, cálculo del incremento de consumo de acetato sobre glucosa y por biomasa formada entre las cepas IMX888 (que usa la estrategia de Medina et al. 2010) y la cepa IMX860 (que usa la estrategia en este ejemplo), se restó el consumo aparente de la cepa de control IMX585 (que no contiene *eutE*) de los valores calculados.

Tabla 20. Máximas velocidades de crecimiento específicas, rendimientos de productos principales y relaciones entre acetato consumido sobre glucosa consumida y biomasa formada. Datos obtenidos a partir de las fermentaciones discontinuas anaerobias realizadas en birreactores, con las cepas IMX585, IMX888 e IMX860. Las fermentaciones se realizaron en medio sintético complementado con 20 g L⁻¹ de glucosa y 3 g L⁻¹ de ácido acético. Los lotes se realizaron a pH 5, burbujeo de 500 mL min⁻¹ de N₂, 30 °C. Los rendimientos y las relaciones se calcularon a partir de los datos recogidos en la fase de crecimiento exponencial. El cálculo de los rendimientos de etanol se basó en datos corregidos para la evaporación. Los datos se presentan como promedios de experimentos duplicados independientes.

Cepa	IMX585	IMX888	IMX860
μ (h ⁻¹)	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Y glicerol/glucosa (g/g)	0,062 ± 0,000	N/D	N/D

Y biomasa/glucosa (g/g)	0,076 ± 0,003	0,075 ± 0,000	0,077 ± 0,000
Y EtOH/glucosa (g/g)	0,421 ± 0,001	0,460 ± 0,001	0,466 ± 0,002
Relación acetato consumido/biomasa (g/g)	0,146 ± 0,006	0,424 ± 0,009	0,534 ± 0,002
Relación acetato consumido/glucosa (g/g)	0,009 ± 0,000	0,032 ± 0,000	0,41 ± 0,000

Considerando en el cálculo la evaporación del etanol, y con mmoles en lugar de g para los cálculos de relación y los datos de adición de glicerol/glucosa (g g^{-1}) para IMX888 e IMX860, los datos se dan en la Tabla 20A.

Tabla 20A

Cepa	IMX585	IMX888	IMX860
μ (h^{-1})	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Y glicerol/glucosa (g g^{-1})	0,060 ± 0,000	<0,001	<0,001
Y biomasa/glucosa (g g^{-1})	0,076 ± 0,003	0,075 ± 0,000	0,077 ± 0,000
Y EtOH/glucosa (g g^{-1})	0,433 ± 0,001	0,474 ± 0,001	0,489 ± 0,000
Relación glicerol producido/biomasa (mmol g^{-1})	8,50 ± 0,04	<0,01	<0,01
Relación acetato consumido/biomasa (mmol g^{-1})	2,44 ± 0,10	6,92 ± 0,12	8,90 ± 0,04
Relación acetato consumido/glucosa (g g^{-1})	0,011 ± 0,00	0,032 ± 0,00	0,042 ± 0,00

5

2.2. Cambio de especificidad del cofactor de G6PDH en la generación de NADH citosólico adicional y la vía reductora de acetato

Recientemente se ha caracterizado una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , designada *azf*, en la arquea *Haloferox volcanii* (Pickl y Schönheit, 2015). En este ejemplo, el efecto de un cambio de cofactor de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de NADP^+ a NAD^+ sobre la generación de NADH citosólico adicional por biomasa formada, *azf* se expresa en exceso en un contexto de *zwf1Δ* de *S. cerevisiae*. Basándose en el análisis teórico y los experimentos realizados en la presente solicitud, se espera un impacto teórico idéntico del cambio de cofactor de 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

10

Se usa la secuencia de proteínas de Azfp (ADE03728.1) de *Haloferox volcanii* DS2 para generar una versión de codones optimizados de levadura de *azf*, basándose en la composición de genes glicolíticos altamente expresados (Wiedemann y Boles, 2008). Se sintetiza un casete de expresión en exceso, bajo el control de un promotor glicolítico constitutivo fuerte, y se clona en un plásmido. El plásmido se usa como molde para generar un producto de PCR en el que el casete de expresión en exceso está flanqueado por secuencias de 60 pb homólogas a las regiones directas en la dirección 5' y en la dirección 3' de *ZWF1*. El locus de *ZWF1* se deletiona entonces usando el sistema CRISPR/Cas9 con el producto de PCR como el fragmento de reparación, dando como resultado una cepa *zwf1::azf*.

15

20

La determinación de la actividad enzimática de Azfp en la cepa *zwf1::azf* se realiza como se describió previamente (Pickl y Schönheit, 2015). Además, se investiga el efecto de la sustitución de *ZWF1* por *azf* sobre la velocidad de crecimiento específica máxima aerobia de la cepa manipulada en un modo idéntico a la forma que se determinó para las cepas IMX705, IMX706 e IMX707 en la presente solicitud.

25

La cepa *zwf1::azf* generada se caracteriza en fermentaciones anaerobias en birreactores con 20 g L^{-1} de glucosa como fuente de carbono y en comparación con su cepa parental, así como la cepa IMX705. Se espera que la cepa rinda similarmente a la cepa IMX705 en términos de rendimiento de glicerol sobre glucosa y la formación de glicerol en biomasa formada y tenga un aumento de al menos 22,6 % en el rendimiento de glicerol sobre glucosa en comparación con su cepa no mutante parental.

30

La cepa *zwf1::azf* se manipula adicionalmente por delección de *GPD1* y *GPD2* e introducción de *eutE* en el locus *GPD2*, usando las mismas etapas que el caso de la construcción de la cepa IMX888. El genotipo relevante de la cepa resultante es *gpd1Δ gpd2::eutE zwf1::azf*.

35

En los experimentos de seguimiento, se investiga el efecto de la estrategia de ingeniería propuesta en este escenario en el consumo anaerobio de acetato. La cepa *gpd1Δ gpd2::eutE zwf1::azf* se cultiva en fermentaciones anaerobias en biorreactores, complementada con 20 g L^{-1} de glucosa y 3 g L^{-1} de ácido acético. El burbujeo, control

de pH, así como la temperatura, son idénticos a los lotes realizados con las cepas IMX585, IMX705 e IMX756. Basándose en el análisis teórico y similarmente a la cepa IMX888, se espera un aumento de 59 % en el acetato consumido por biomasa formado en esta cepa en comparación con la cepa reductora de acetato IMX860, en la que no se ha hecho cambio de cofactor de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

5 **2.2 Cambio simultáneo de la especificidad del cofactor de G6PDH y 6PGDH en la generación de NADH citosólico adicional y la vía reductora de acetato**

Para investigar el efecto de un cambio simultáneo del cofactor de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa de NADP⁺ a NAD⁺ en la generación de NADH citosólico adicional por biomasa formada, se expresan en exceso *azf* y *gndA* en una cepa *zwf1Δ gnd1Δ gnd2Δ*.

10 La generación de un casete de expresión en exceso de *azf* se realiza como se describió previamente en la presente solicitud. La construcción de cepas se realiza idénticamente a la descrita para la cepa *zwf1::azf*. En este caso, se usa la cepa IMX705 como parental. El genotipo relevante resultante de la cepa generada es *gnd2Δ gnd1::gndA zwf1::azf*.

15 La determinación de la actividad enzimática de Azfp en la cepa *zwf1::azf* se realiza como se describió previamente (Pickl y Schönheit, 2015). La determinación de la actividad enzimática de GndAp se realiza como se describió en la presente solicitud.

20 La cepa *gnd2Δ gnd1::gndA zwf1::azf* generada se caracteriza en fermentaciones anaerobias en biorreactores con 20 g L⁻¹ de glucosa como fuente de carbono y en comparación con su cepa IMX705 parental, así como la cepa IMX585 (sin cambio de especificidad del cofactor). En este escenario, NADPH se genera principalmente mediante la reacción catalizada por Ald6p. La cantidad de NADH adicional que se genera por biomasa formada se determina por el flujo de glucosa a través de la parte oxidativa de la vía de la pentosa-fosfato. En este escenario, suponiendo 100 % de especificidad por NAD⁺, el flujo a través de la parte oxidativa de la pentosa-fosfato ya no se acopla a la generación de NADPH. En un escenario donde las enzimas usan preferentemente NAD⁺, pero también muestran actividad hacia NADP⁺, el flujo a través de esta vía se puede correlacionar todavía a la provisión de NADPH. Se espera que el cambio de los cofactores de tanto glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como 6-fosfogluconato deshidrogenasa dé como resultado un aumento adicional de la formación de NADH citosólico por biomasa formada, cuando se compara con el cambio de cualquier cofactor solo.

25 La cepa *gnd2Δ gnd1::gndA zwf1::azf* se manipula adicionalmente por delección de *GPD1* y *GPD2* e introducción de *eutE* en el locus *GPD2*, usando las mismas etapas que el caso de la construcción de la cepa IMX888. El genotipo relevante de la cepa resultante es *gpd1Δ gpd2::eutE gnd2Δ gnd1::gndA zwf1::azf*.

30 En los experimentos de seguimiento, se investiga el efecto de la estrategia de manipulación propuesta en este escenario en el consumo de acetato anaerobio. La cepa *gpd1Δ gpd2::eutE gnd2Δ gnd1::gndA zwf1::azf* se cultiva en fermentaciones anaerobias en biorreactores, complementada con 20 g L⁻¹ de glucosa y 3 g L⁻¹ de ácido acético. El burbujeo, control de pH, así como la temperatura, son idénticos a los lotes realizados con las cepas IMX585, IMX705 e IMX756. Se espera en este caso un aumento del consumo de acetato por biomasa formada en comparación con la cepa IMX860 y *gpd1Δ gpd2::eutE zwf1::azf*.

Las ventajas de las cepas según la invención, como se muestran en los ejemplos, se resumen en la Tabla 21,

Tabla 21 Aumento del rendimiento para etanol y glicerol y acetato consumido con valores teóricamente calculados (entre paréntesis), en comparación con cepa no mutante y para el escenario de acetato (biocombustible) y el escenario de glicerol (vino).

40

	Escenario de acetato (combustible de bioetanol) en comparación con la cepa de Medina et al. 2010	Escenario de glicerol (vino) en comparación con la cepa no mutante
Rendimiento de etanol en glucosa	1,3 % (3 %)	~0 % (-4,5 %)
Aumento en %		
Rendimiento de glicerol		38 % (40,5 %)
Aumento en %		
Consumo de acetato (% de aumento (g de acetato / g de biomasa))	28 % (59 %)	
Rendimiento de biomasa		-13,2 %(-11,5 %)

A partir de la Tabla 21 es evidente que se pueden obtener ventajas sustanciales:

Para aplicación en la industria de los biocombustibles, es ventajoso 28 % de aumento de consumo de acetato y 1,3 % de aumento en el rendimiento de etanol.

- 5 Para la aplicación en la industria vitivinícola, es ventajoso hasta 38 % de aumento de rendimiento de glicerol y la misma producción de etanol o más baja.

Basándose en los datos y cálculos de las Tablas 19A y 20A, como la Tabla resumen 21, está a continuación la Tabla resumen 21A:

Tabla 21A

	Escenario de acetato (combustible de bioetanol) en comparación con la cepa de Medina et al. 2010	Escenario de glicerol (vino) en comparación con la cepa no mutante
Rendimiento de etanol en glucosa Aumento en %	3 % (3 %)	~0,5 (en el margen de error) % (-4,5 %)
Rendimiento de glicerol Aumento en %	-	39 % (40,5 %)
Consumo de acetato (% de aumento (g de acetato / g de biomasa))	44 % (59 %) o 31 % (59 %) (sin corrección para el consumo aparente no mutante)	
Rendimiento de biomasa	+2,6 %	-11,7 ± 3 % %(-11,5 %)

10

De la Tabla 21A es evidente que se pueden obtener ventajas sustanciales:

Para aplicación en la industria de los biocombustibles, es ventajoso 44 % de aumento de consumo de acetato por gramo de biomasa formada y 3 % de aumento en el rendimiento de etanol en glucosa.

- 15 Para la aplicación en la industria vitivinícola, es ventajoso hasta 39 % de aumento de rendimiento de glicerol y la misma producción de etanol o más baja.

Referencias

20 Medina VG, Almering MJH, Van Maris AJA, Pronk JT. 2010. Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to use acetic acid as an electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology* 76:190-195. (Medina et al. 2010);

25 van Dijken JP, Bauer J, Brambilla L, Duboc P, Francois JM, Gancedo C, Giuseppin MLF, Heijnen JJ, Hoare M, Lange HC, Madden EA, Niederberger P, Nielsen J, Parrou JL, Petit T, Porro D, Reuss M, van Riel N, Rizzi M, Steensma HY, Verrips CT, Vindeløv J, Pronk JT. 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme and Microbial Technology* 26:706-714. (van Dijken et al. 2000);

Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8:501-517. (Verduyn et al. 1992);

Müller UM, Wu L, Raamsdonk LM, Winkler AA. Acetyl-coa producing enzymes in yeast. (Wiedemann and Boles, 2008);

30 Documento de patente US 20100248233 A1. Prioridad 30-9-2010. (Müller et al. 2010);

Gietz RD, Woods RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* 350:87-96. (Gietz and Woods, 2002);

Solis-Escalante D, Kuijpers NGA, Bongaerts N, Bolat I, Bosman L, Pronk JT, Daran JM, Daran-Lapujade P. 2013. amdSYM, a new dominant recyclable marker cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 13:126-139. (Solis-Escalante et al. 2013);

5 DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Research 41:8. (DiCarlo et al. 2013);

Maris R, van Rossum HM, Wijsman M, Backx A, Kuijpers NG, van den Broek M, Daran-Lapujade P, Pronk JT, van Maris AJ, Daran JM. 2015. CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research; 15: fov004 (Maris et al. 2015);

10 Pickl et al. FEMS Biotechnology Letters, Volume 361, Issue 1, p. 76-83, December 2014: Identification and characterization of 2-keto-3-deoxygluconate kinase and 2-keto-3-deoxygalactonate kinase in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* (Pickl and Schönheid 2015).

Listado de secuencias

<110> DSM IP Assets B.V.

15

<120> CÉLULA EUCARIOTA CON ELEVADA PRODUCCIÓN DE PRODUCTO DE FERMENTACIÓN

<130> 31463-WO-PCT

20

<150>EP15188645.4

<151> 06-10-2015

<160> 53

25

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1819

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete gndA

35

<400> 1

ES 2 767 728 T3

gcgataccct gcgatcttcg agacctaaact acatagtgtt taaagattac ggatatttaa 60
 cttacttaga ataatgccat ttttttgagt tataataatc ctacgttagt gtgagcggga 120
 tttaaactgt gaggacctta atacattcag acacttctgc ggtatcacc cacttattcc 180
 cttcgagatt atatctagga acccatcagg ttggtggaag attaccggt ctaagacttt 240
 tcagcttcct ctattgatgt tacacctgga caccctttt ctggcatcca gtttttaatc 300
 ttcagtggca tgtgagattc tccgaaatta attaaagcaa tcacacaatt ctctcggata 360
 ccacctcggg tgaaactgac aggtgggttg ttacgcatgc taatgcaaag gaggctatat 420
 acctttggct cggctgctgt aacagggaat ataaagggca gcataattta ggagtttagt 480
 gaacttgcaa catttactat tttcccttct tacgtaaata tttttctttt taattctaaa 540
 tcaatctttt tcaatttttt gtttgtattc ttttcttctg taaatctata actacaaaaa 600
 acacatacat aactaaaaa tgaagttggc tattattggt ttgggtaaga tgggtggtaa 660
 catggctaga agattgttga agcacgggat tgaagttgtt ggtttcgact tcaaccaaga 720
 cgctgttaac caaatttctt tgaccaacgg tatgattcca gcttcttctg ttgaagacgc 780
 tgtttctaag ttgtctggtg aaccaagaaa gattgtttgg attatggtgc catctggtga 840
 cattaccgaa aaccaaatta aggacttggg tccattggtg tctaagggtg acattattgt 900
 tgacgggtgt aactctaact acaagcactc tcaaagaaga ggtgcttggg tggctgaaca 960
 cggattgaa ttcattgact gtggtacctc tgggtggtatt tggggtttgg acaacggta 1020
 ctgtttgatg tacggtgggt ctaaggacgc tgctgacgct gttgttccaa ttatgcaagc 1080
 tttggctcac gctgacagag gttgggctca cgttgggtcca gttgggtctg gtcactcac 1140
 caagatgatt cacaacggta ttgaatacgg tatgatgcaa gctttcgctg aaggtttggg 1200
 cttggtgaag ggtaagggaag aattcaactt ggacttggct caaattaccg aattgtggag 1260
 acacggttct gttgttagat cttggttgtt ggacttgacc gctgaagctt tggctcacga 1320
 ccaagaattg tctgctattg ctccatacgt tgctgactct ggtgaaggtg gatggaccgt 1380
 tgttgaagct gttgaccaag gtgttgctgc tccagttttg accttggctt tgcaaatgag 1440
 attcgcttct caagaagaca ccggttactc ttacaagttg ttgtctatga tgagaaacgc 1500
 tttcgggtgg cagctgtta agaccaagta acaggccctt tttcctttgt cgatatcatg 1560
 taattagta tgtcacgctt acattcacgc cctccccca catccgctct aaccgaaaag 1620
 gaaggagtta gacaacctga agtctaggtc cctatattt tttttatagt tatgttagta 1680
 ttaagaacgt tatttatatt tcaaattttt cttttttttc tgtacaaacg cgtgtacgca 1740
 tgtaacatta tactgaaaac cttgcttgag aaggttttgg gacgctcgaa ggctttaatt 1800
 tgcttcgcta atctgcgcg 1819

<210> 2

5 <211> 303

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína GndA (Methylobacillus flagellates)

5

<400> 2

```

Met Lys Leu Ala Ile Ile Gly Leu Gly Lys Met Gly Gly Asn Met Ala
1      5      10      15
Arg Arg Leu Leu Lys His Gly Ile Glu Val Val Gly Phe Asp Phe Asn
20      25      30
Gln Asp Ala Val Asn Gln Ile Ser Leu Thr Asn Gly Met Ile Pro Ala
35      40      45
Ser Ser Val Glu Asp Ala Val Ser Lys Leu Ser Gly Glu Pro Arg Lys
50      55      60
Ile Val Trp Ile Met Leu Pro Ser Gly Asp Ile Thr Glu Asn Gln Ile
65      70      75      80
Lys Asp Leu Val Pro Leu Leu Ser Lys Gly Asp Ile Ile Val Asp Gly
85      90      95
Gly Asn Ser Asn Tyr Lys His Ser Gln Arg Arg Gly Ala Trp Leu Ala
100     105     110
Glu His Gly Ile Glu Phe Ile Asp Cys Gly Thr Ser Gly Gly Ile Trp
115     120     125
Gly Leu Asp Asn Gly Tyr Cys Leu Met Tyr Gly Gly Ser Lys Asp Ala
130     135     140
Ala Asp Ala Val Val Pro Ile Met Gln Ala Leu Ala His Ala Asp Arg
145     150     155     160
Gly Trp Ala His Val Gly Pro Val Gly Ser Gly His Phe Thr Lys Met
165     170     175
Ile His Asn Gly Ile Glu Tyr Gly Met Met Gln Ala Phe Ala Glu Gly
180     185     190
Leu Asp Leu Leu Lys Gly Lys Glu Glu Phe Asn Leu Asp Leu Ala Gln
195     200     205
Ile Thr Glu Leu Trp Arg His Gly Ser Val Val Arg Ser Trp Leu Leu
210     215     220

Asp Leu Thr Ala Glu Ala Leu Ala His Asp Gln Glu Leu Ser Ala Ile
225     230     235     240
Ala Pro Tyr Val Ala Asp Ser Gly Glu Gly Arg Trp Thr Val Val Glu
245     250     255
Ala Val Asp Gln Gly Val Ala Ala Pro Val Leu Thr Leu Ala Leu Gln
260     265     270
Met Arg Phe Ala Ser Gln Glu Asp Thr Gly Tyr Ser Tyr Lys Leu Leu
275     280     285
Ser Met Met Arg Asn Ala Phe Gly Gly His Ala Val Lys Thr Lys
290     295     300
    
```

10 <210> 3

<211> 1906

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Casete gox1705

<400> 3

ES 2 767 728 T3

gcgataccct gcgatcttcg agacctaact acatagtgtt taaagattac ggatatttaa 60
 cttacttaga ataatgccat ttttttgagt tataataatc ctacgttagt gtgagcggga 120
 tttaaactgt gaggacctta atacattcag acacttctgc ggtatcacc cacttattcc 180
 cttcgagatt atatctagga acccatcagg ttggtggaag attaccggt ctaagacttt 240
 tcagcttcct ctattgatgt tacacctgga caccctttt ctggcatcca gtttttaatc 300
 ttcagtggca tgtgagattc tccgaaatta attaaagcaa tcacacaatt ctctcggata 360
 ccacctcggg tgaaactgac aggtgggttg ttacgcatgc taatgcaaag gagcctatat 420
 acctttggct cggctgctgt aacagggaat ataaagggca gcataattta ggagtttagt 480
 gaacttgcaa catttactat tttcccttct tacgtaaata tttttctttt taattctaaa 540
 tcaatctttt tcaatttttt gtttgtattc ttttcttctgct taaatctata actacaaaaa 600
 acacatacat aaactaaaaa tgagaattgg tattattggg ttgggtagaa tgggtggtaa 660
 cattgctggt agattgacca gacacgggtca cgacgttgtt gttcacgaca gaacctctga 720
 agttaccacc tctgttgttg gtagatgtga agctggtaga gctaccaccag ctgacacctt 780
 ggctgacatg gctaagttgt tggagggtga cgaacacaga gttggttggg ttatgttggc 840
 agctgggtgct attaccgaag actgtgttca acaattgggt gtttgttgg gtagagggtga 900
 cattattatt gacggtggta acacctacta caaggacgac gttagaagat ctgctgaatt 960
 ggctgaaaag ggtatttctt acgttgacgt tggtagctct ggtggtggtt ggggtttgga 1020
 aagaggttac tgtatgatgt tcggtggtac caaggaaacc gctgaatata ttgacccaat 1080
 tttgtctgct ttggtccag gtattggtga cgttccaaga accccaggta gagacgaagc 1140
 tggtcacgac ccaagagctg aacaaggtta cttgcactgt ggtccagctg gttctggtca 1200
 cttcgtaag atggttcaca acggtattga atacggtatg atgcaagctt tcgctgaagg 1260
 tttcgacatt atgaagtcta agaactctcc aattttggct gaaaaggaca gattcgaatt 1320
 gaacatgggt gacattgctg aagtttgag aagagttct gttgtttctt cttggttgtt 1380
 ggacttgacc gctgaagctt tgaccagatc tgaaaccttg aacgaattct ctggtgaagt 1440
 tgctgactct ggtgaaggta gatggaccat tgaagctgct attgaagaag acgttccagc 1500
 tccagttatg accgctgctt tgttcaccag attcagatct agatctggt acaacttcgc 1560
 tgaaaagatt ttgtctgctc aaagattcgg tttcgggtgt cacgttgaaa agaagtaaca 1620
 ggcccccttt cctttgtcga tatcatgtaa ttagttatgt cacgcttaca ttcacgcctt 1680
 cccccacat ccgctctaac cgaaaaggaa ggagttagac aacctgaagt ctaggccctt 1740
 atttattttt ttatagttat gttagtatta agaacgttat ttatatttca aatttttctt 1800
 ttttttctgt acaaacgctg gtacgcatgt aacattatac tgaaaacctt gcttgagaag 1860
 gttttgggac gctcgaaggc ttaatttgc ttcgctaate tgccgcg 1906

<210> 4

5 <211> 332

<212> PRT

ES 2 767 728 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína Gox1705 (Gluconobacter oxidans 621H)

5

<400> 4

```

Met Arg Ile Gly Ile Ile Gly Leu Gly Arg Met Gly Gly Asn Ile Ala
1      5      10      15
Val Arg Leu Thr Arg His Gly His Asp Val Val Val His Asp Arg Thr
20      25      30
Ser Glu Val Thr Thr Ser Val Val Gly Arg Cys Glu Ala Gly Arg Ala
35      40      45
Thr Pro Ala Asp Thr Leu Ala Asp Met Ala Lys Leu Leu Glu Gly Asp
50      55      60
Glu His Arg Val Val Trp Val Met Leu Pro Ala Gly Ala Ile Thr Glu
65      70      75      80
Asp Cys Val Gln Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gly Arg Gly Asp Ile Ile
85      90      95
Ile Asp Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Lys Asp Asp Val Arg Arg Ser Ala
100     105     110
Glu Leu Ala Glu Lys Gly Ile Ser Tyr Val Asp Val Gly Thr Ser Gly
115     120     125
Gly Val Trp Gly Leu Glu Arg Gly Tyr Cys Met Met Phe Gly Gly Thr
130     135     140
Lys Glu Thr Ala Glu Tyr Ile Asp Pro Ile Leu Ser Ala Leu Ala Pro
145     150     155     160
Gly Ile Gly Asp Val Pro Arg Thr Pro Gly Arg Asp Glu Ala Gly His
165     170     175
Asp Pro Arg Ala Glu Gln Gly Tyr Leu His Cys Gly Pro Ala Gly Ser
180     185     190
Gly His Phe Val Lys Met Val His Asn Gly Ile Glu Tyr Gly Met Met
195     200     205
Gln Ala Phe Ala Glu Gly Phe Asp Ile Met Lys Ser Lys Asn Ser Pro
210     215     220
Ile Leu Ala Glu Lys Asp Arg Phe Glu Leu Asn Met Gly Asp Ile Ala
225     230     235     240
Glu Val Trp Arg Arg Gly Ser Val Val Ser Ser Trp Leu Leu Asp Leu
245     250     255
Thr Ala Glu Ala Leu Thr Arg Ser Glu Thr Leu Asn Glu Phe Ser Gly
260     265     270
Glu Val Ala Asp Ser Gly Glu Gly Arg Trp Thr Ile Glu Ala Ala Ile
275     280     285
Glu Glu Asp Val Pro Ala Pro Val Met Thr Ala Ala Leu Phe Thr Arg
290     295     300
Phe Arg Ser Arg Ser Gly Asn Asn Phe Ala Glu Lys Ile Leu Ser Ala
305     310     315     320
Gln Arg Phe Gly Phe Gly Gly His Val Glu Lys Lys
325     330

```

10

<210> 5

<211> 1906

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Casete 6pgdh

ES 2 767 728 T3

<400> 5

gcgataccct gcgatcttcg agacctaaact acatagtgtt taaagattac ggatatttaa 60
 cttacttaga ataatgccat ttttttgagt tataataatc ctacgttagt gtgagcggga 120
 tttaaactgt gaggacctta atacattcag acacttctgc ggtatcacc cacttattoc 180
 cttcgagatt atatctagga acccatcagg ttggtggaag attaccggt ctaagacttt 240
 tcagcttctt ctattgatgt tacacctgga caccctttt ctggcatcca gtttttaatc 300
 ttcagtggca tgtgagattc tccgaaatta attaaagcaa tcacacaatt ctctcggata 360
 ccacctcggg tgaaactgac aggtgggttg ttacgcattc taatgcaaag gagcctatat 420
 acctttggct cggctgctgt aacaggggat ataaaggcca gcataattta ggagtttagt 480
 gaacttgcaa catttactat tttcccttct tacgtaaata tttttctttt taattctaaa 540
 tcaatctttt tcaatttttt gtttgtattc ttttcttctt taaatctata actacaaaaa 600
 acacatacat aaactaaaaa tgcaattggg tatgattggt ttgggtagaa tgggtggtaa 660
 cattgttaga agattgatga gacacgggtc ctctaccggt gtttacgaca aggacgctaa 720
 ggctgttgct ggtttgctg ctgacgggtc tgttggttct gctaccttgg aagaattcgt 780
 tgctaagttg gaaagaccaa gaaccgcttg gggtatggtt ccagctggtg gaattaccga 840
 aaccaccatt gacaccattg ctggtgttat gcaagaagg gacgttatta ttgacggtgg 900
 taacaccttc tggcaagacg acgttagaag aggtaaaggct ttgaaggcta gaggtattca 960
 ctacgttgac gttggtacct ctggtggtgt ttggggttg gacagaggtt actgtatgat 1020
 gattggtggt gaaaagcaag ttggtgacag attggacca attttcgctg ctttggtcc 1080
 aggtgctggt gacattccaa gaaccgaag tagagaagg agagaccaa gaattgaaca 1140
 aggttacatt cacgctggtc cagttggtc tggctacttc gtaaatga ttcacaacgg 1200
 tattgaatac ggtttgatgc aagcttacgc tgaaggttc gacattttga agaacgctaa 1260
 cattgacgct ttgccagctg accacagata cgacttcgac ttggctgaca ttgctgaagt 1320
 ttggagaaga ggttctgta tccatcttg gttgttgac ttgacctta ccgctttggc 1380
 tgactctcca gctttggctg aatactctgg tttcgttgaa gactctggtg aaggtagatg 1440
 gaccgttaac gctgctattg acgaagctgt tccagctgaa gttttgaccg ctgctttgta 1500
 caccagattc agatctagaa aggaacacac cttcgtgaa aagattttgt ctgctatgag 1560
 agctggtttc ggtggtcaca aggaaccaa gcaaccagg gcttctaagc caaagtaaca 1620
 ggcccctttt cttttgctga tatcatgtaa ttagttatgt cacgcttaca ttcacgcct 1680
 cccccacat ccgctctaac cgaaaaggaa ggagttagac aacctgaagt ctaggtccct 1740
 atttatttt ttatagttat gttagtatta agaacgttat ttatatttca aattttctt 1800
 tttttctgt acaaacgct gtacgcatgt aacattatac tgaaaacctt gcttgagaag 1860
 gttttgggac gctcgaaggc ttaatttgc ttcgctaate tgcgcg 1906

5

<210> 6

ES 2 767 728 T3

<211> 332

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Proteína 6pgdh WP_011089498.1 (múltiples especies [Bradyrhizobium])

<400> 6

```

Met Gln Leu Gly Met Ile Gly Leu Gly Arg Met Gly Gly Asn Ile Val
 1      5      10      15
Arg Arg Leu Met Arg His Gly His Ser Thr Val Val Tyr Asp Lys Asp
 20      25      30
Ala Lys Ala Val Ala Gly Leu Ala Ala Asp Gly Ala Val Gly Ser Ala
 35      40      45
Thr Leu Glu Glu Phe Val Ala Lys Leu Glu Arg Pro Arg Thr Ala Trp
 50      55      60
Val Met Leu Pro Ala Gly Arg Ile Thr Glu Thr Thr Ile Asp Thr Ile
 65      70      75      80
Ala Gly Val Met Gln Glu Gly Asp Val Ile Ile Asp Gly Gly Asn Thr
 85      90      95
Phe Trp Gln Asp Asp Val Arg Arg Gly Lys Ala Leu Lys Ala Arg Gly
 100     105     110
Ile His Tyr Val Asp Val Gly Thr Ser Gly Gly Val Trp Gly Leu Asp
 115     120     125
Arg Gly Tyr Cys Met Met Ile Gly Gly Glu Lys Gln Val Val Asp Arg
 130     135     140
Leu Asp Pro Ile Phe Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Gly Asp Ile Pro
 145     150     155     160
Arg Thr Glu Gly Arg Glu Gly Arg Asp Pro Arg Ile Glu Gln Gly Tyr
 165     170     175
Ile His Ala Gly Pro Val Gly Ala Gly His Phe Val Lys Met Ile His
 180     185     190
Asn Gly Ile Glu Tyr Gly Leu Met Gln Ala Tyr Ala Glu Gly Phe Asp
 195     200     205
Ile Leu Lys Asn Ala Asn Ile Asp Ala Leu Pro Ala Asp His Arg Tyr
 210     215     220

Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Ala Glu Val Trp Arg Arg Gly Ser Val
 225     230     235
Ile Pro Ser Trp Leu Leu Asp Leu Thr Ser Thr Ala Leu Ala Asp Ser
 245     250     255
Pro Ala Leu Ala Glu Tyr Ser Gly Phe Val Glu Asp Ser Gly Glu Gly
 260     265     270
Arg Trp Thr Val Asn Ala Ala Ile Asp Glu Ala Val Pro Ala Glu Val
 275     280     285
Leu Thr Ala Ala Leu Tyr Thr Arg Phe Arg Ser Arg Lys Glu His Thr
 290     295     300
Phe Ala Glu Lys Ile Leu Ser Ala Met Arg Ala Gly Phe Gly Gly His
 305     310     315     320
Lys Glu Pro Lys Gln Pro Gly Ala Ser Lys Pro Lys
 325     330

```

10

<210> 7

<211> 789

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 767 728 T3

<220>

<223> Gen azf de codones optimizados

<400> 7

5

```
atggaccaac cagttttggt gaccggtgct ggtgtagag ttggtcaagc tattttgggt    60
cacattggtg acgcttacga ctggagattg ttggacagag aaccattgtc tgacgaaaag    120
attccagact ctgttgactc taccgaagtt tacgttgctg acgttacoga cgaaaccgct    180
gtagaaaacg ctatggacgg tgttcacgct gttattcact tggctggtga cccaagacca    240
gaagctccat gggactctgt tttgagaaac aacattgacg gtaccaaca aatgttcgac    300
gctgctgttg acgttgggtg tgaaaagttc gctttcgctt cttctaacca cgctgttggg    360
gcttacgaaa ccaccgacag aaccccagac atgtacagac cacaccacga attcagattg    420
gacggtaccg aattgccaag accatctaac ttgtacggtg tttctaaggc tgctggtgaa    480
acottgggta gatactacca cgaccaccac gacatttctg ttgttaacgt tagaattggt    540
aacttgacc c aacaccacc accaaaggaa tacgaaagag gtcaagctat gtggttgtct    600
tacagagact gtggtcactt gttcgaatgt tgtattgaag ctgactacga ctacgaaatt    660
gtttacggta tttctgacaa cgacagaaag tactactcta ttgacagagc tagagctggt    720
ttgggttacg accacaaga caactctgct gaattcacct tcgaaggtga accattggac    780
gaagcttaa                                     789
```

<210> 8

<211> 262

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína azf (ADEE03728.1, Haloferax volcanii)

15

<400> 8

ES 2 767 728 T3

Met Asp Gln Pro Val Leu Leu Thr Gly Ala Gly Gly Arg Val Gly Gln
 1 5 10 15
 Ala Ile Leu Gly His Ile Gly Asp Ala Tyr Asp Trp Arg Leu Leu Asp
 20 25 30
 Arg Glu Pro Leu Ser Asp Glu Lys Ile Pro Asp Ser Val Asp Ser Thr
 35 40 45
 Glu Val Tyr Val Ala Asp Val Thr Asp Glu Thr Ala Val Arg Asn Ala
 50 55 60
 Met Asp Gly Val His Ala Val Ile His Leu Ala Gly Asp Pro Arg Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Pro Trp Asp Ser Val Leu Arg Asn Asn Ile Asp Gly Thr Gln
 85 90 95
 Gln Met Phe Asp Ala Ala Val Asp Val Gly Val Glu Lys Phe Ala Phe
 100 105 110
 Ala Ser Ser Asn His Ala Val Gly Ala Tyr Glu Thr Thr Asp Arg Thr
 115 120 125
 Pro Asp Met Tyr Arg Pro His His Glu Phe Arg Leu Asp Gly Thr Glu
 130 135 140
 Leu Pro Arg Pro Ser Asn Leu Tyr Gly Val Ser Lys Ala Ala Gly Glu
 145 150 155 160
 Thr Leu Gly Arg Tyr Tyr His Asp His His Asp Ile Ser Val Val Asn
 165 170 175
 Val Arg Ile Gly Asn Leu Thr Gln His His Pro Pro Lys Glu Tyr Glu
 180 185 190
 Arg Gly Gln Ala Met Trp Leu Ser Tyr Arg Asp Cys Gly His Leu Phe
 195 200 205
 Glu Cys Cys Ile Glu Ala Asp Tyr Asp Tyr Glu Ile Val Tyr Gly Ile
 210 215 220
 Ser Asp Asn Asp Arg Lys Tyr Tyr Ser Ile Asp Arg Ala Arg Ala Val
 225 230 235 240
 Leu Gly Tyr Asp Pro Gln Asp Asn Ser Ala Glu Phe Thr Phe Glu Gly
 245 250 255
 Glu Pro Leu Asp Glu Ala
 260

<210> 9

<211> 2466

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete eutE

10

<400> 9

ES 2 767 728 T3

gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgacatgat tacgccaagc 60
gcgcaattaa ccctcactaa agggaacaaa agctggagct cagtttatca ttatcaatac 120
tcgccatttc aaagaatacg taaataatta atagtagtga ttttcctaac tttatttagt 180
caaaaaatta gccttttaat tctgctgtaa cccgtacatg cccaaaatag ggggcgggtt 240
acacagaata tataacatcg taggtgtctg ggtgaacagt ttattcctgg catccactaa 300
atataatgga gcccgctttt taagctggca tccagaaaaa aaaagaatcc cagcaccaaa 360
atattgtttt cttcaccaac catcagttca taggtccatt ctcttagcgc aactacagag 420
aacaggggca caaacaggca aaaaacgggc acaacctcaa tggagtgatg caacctgcct 480
ggagtaaatg atgacacaag gcaattgacc cacgcatgta tctatctcat tttcttacac 540

ES 2 767 728 T3

cttctattac cttctgctct ctctgatttg gaaaaagctg aaaaaaaagg ttgaaaccag 600
 ttccttgaaa ttattcccct acttgactaa taagtatata aagacggtag gtattgattg 660
 taattctgta aatctatttc ttaaacttct taaattctac ttttatagtt agtctttttt 720
 ttagtthtaaa aacaccagaa cttagtttctg acggattcta gaactagtaa aaaatgaacc 780
 aacaagatat cgaacaagtt gtcaaggctg tcttgttgaa aatgcaatct tctgacactc 840
 catctgctgc tgtccacgaa atgggtggtt tctgttcttt ggacgacgct gttgctgctg 900
 ccaaggttgc tcaacaaggt ttgaaatctg ttgccatgag acaattggcc attgctgcca 960
 tcagagaagc tgggtgaaaag catgccagag acttggctga attggctgct tccgaaaccg 1020
 gtatgggtag agttgaagac aaattcgcta agaacgttgc tcaagctaga ggtactccag 1080
 gtgtcgaatg tttgtctcca caagtcttga ccgggtgataa tggtttgact ttgattgaaa 1140
 atgctccatg ggggtgttgt gcttccgtca ccccatctac caaccagct gctactgtca 1200
 tcaacaacgc catctctttg attgctgctg gtaactcctt tatcttctgct ccacaccag 1260
 ctgccaaaga ggtttctcaa agagccatca ctctattgaa ccaagccatt gttgctgctg 1320
 gtggtccaga aaacttgttg gtcactgttg ccaaccaga tatcgaaact gctcaaagat 1380
 tattcaagtt cccaggtatc ggtctattag tctgactgg tgggtgaagct gttgttgaag 1440
 ctgccagaaa gcacaccaac aagagattga ttgctgctgg tctggtgtaac cctcctggtg 1500
 ttgtcgatga aaccgctgat ttggccagag ctgctcaatc cattgtcaag ggtgcttctt 1560
 tcgacaacaa catcatctgt gctgacgaaa aggttttgat tgttgttgac tccgttctg 1620
 acgaattgat gagattgatg gaaggtcaac atgccgtcaa gttgactgct gaacaagctc 1680
 aacaattgca accagttttg ttgaagaaca tcgatgaaag aggtaagggt accgtctcca 1740
 gagactgggt tggtagagat gctggtgaga ttgctgctgc catcggtttg aaggttccac 1800
 aagaaaccag attattatc gtcgaaacca ccgctgaaca cccatttctg gtcactgaat 1860
 tgatgatgcc agtcttacca gttgtccgtg ttgctaactg tctgacgct attgctttgg 1920
 ctgtcaaatt ggaaggtggt tgtcaccaca ctgctgccat gactccaga aacatcgaaa 1980
 acatgaacca aatggctaac gccattgaca cttccatctt tgtcaagaac ggtccatgta 2040
 tcgctggttt gggtttgggt ggtgaagggt ggaccaccat gaccatcacc accccaactg 2100
 gtgaagggtg cacttctgcc agaacttctg tcagattacg tcttgtgtt ttggtcgatg 2160
 ctttcagaat tgtttaaact gcagtcgact cgagtcatgt aattagttat gtcacgctta 2220
 cattcacgcc ctccccccac atccgctcta accgaaaagg aaggagttag acaacctgaa 2280
 gtctaggtcc ctatttattt ttttatagtt atgtagtat taagaacgtt atttatattt 2340
 caaatttttc tttttttct gtacagacgc gtgtacgcat gtaacattat actgaaaacc 2400
 ttgcttgaga aggttttggg acgctcgaag gctttaattt gcggccgctc tagaactagt 2460
 ggatcc 2466

<210> 10

5 <211> 20

<212> ADN

ES 2 767 728 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> confirmación de cebador de delección de GPD2

5

<400> 10

ccaaatgcca catgagtcac 20

<210> 11

10

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> confirmación de cebador de delección de GPD2

<400> 11

acggacctat tgccattg 18

20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> confirmación de cebador de delección de GND1

<400> 12

cctgttgcc ttccttacg 20

30

<210> 13

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> confirmación de cebador de delección de GND1

ES 2 767 728 T3

<400> 13

aaatgggcct gatgtcg 18

<210> 14

5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> confirmación de cebador de delección de ALD6

<400> 14

atcccggtg gaaactaac 20

15

<210> 15

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> confirmación de cebador de delección de ALD6

<400> 15

aggcacaagc ctgttctc 18

25

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> confirmación de cebador de delección de GPD1

<400> 16

35

tcctcgtag atcaggtcag 20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> confirmación de cebador de delección de GPD1

<400> 17

acggtgagct ccgtattatc 20

10

<210> 18

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador para la amplificación del esqueleto de pMEL11

<400> 18

20

gttttagagc tagaaatagc aagttaaata aag 33

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación del esqueleto de pROS11

30

<400> 19

gatcatttat ctttcactgc ggag 24

<210> 20

<211> 20

35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 767 728 T3

<220>

<223> Cebador para la amplificación de la secuencia de inserción de pMEL11

<400> 20

5 tattgacgcc gggcaagagc 20

<210> 21

<211> 17

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación del esqueleto de pMEL11

15 <400> 21

cgaccgagtt gctcttg 17

<210> 22

<211> 104

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador para la amplificación del esqueleto de la secuencia de inserción de pROS11 (que se dirige a GPD1)

<400> 22

gtgcgcatgt ttcggcgttc gaaacttctc cgcagtgaaa gataaatgat cgggcaagga 60

cgtcgacccat agtttttagag ctagaaatag caagttaaaa taag 104

30

<210> 23

<211> 104

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

ES 2 767 728 T3

<223> Cebador para la amplificación del esqueleto de la secuencia de inserción de pROS11 (que se dirige a GPD2)

<400> 23

5

```

gtgCGcatgt ttcggcgttc gaaacttctc cgcagtgaaa gataaatgat cccaagaatt    60
cccattattc ggttttagag ctagaaatag caagttaaaa taag                        104

```

<210> 24

<211> 120

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en GPD1)

15

<400> 24

```

tggTattggc agtttcgtag ttatatatat actaccatga gtgaaactgt tacgttacct    60
gcattatgTc atttctcata actactttat cacgtagaa attacttatt attattaat     120

```

20

<210> 25

<211> 120

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en GPD1)

<400> 25

30

```

atttaataat aataagtaat ttctaactgTg ataaagtagt tatgagaat gacataatgc    60
agTtaactgTc acagtttcac tcatgtagt atatatataa ctacgaaact gccaatacca   120

```

<210> 26

<211> 120

<212> ADN

ES 2 767 728 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación de la inserción de pMEL11 (que se dirige a GND2)

5

<400> 26

gttgataacg gactagcctt attttaactt gctatttcta gctctaaaac tatgatctgg 60

cagcttcgcg gatcatttat ctttcaactgc ggagaagttt cgaacgccga aacatgcgca 120

10

<210> 27

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador para la confirmación de la delección de GND2

<400> 27

tctgacaggt ggcagttcc 20

20

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador para la confirmación de la delección de GND2

<400> 28

30

atccgaaagg cggaatagg 20

<210> 29

<211> 120

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

ES 2 767 728 T3

<220>

<223> Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en GND2)

<400> 29

5

aagaattcgt aggtgcaggt gagcatattg ccggataagt gtagttacgc aactacaatt 60

gttactaagg cccaatccgg ttggagaaga actattgcc ttgctgctac ttacggtatt 120

<210> 30

<211> 120

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en GND2)

15

<400> 30

aataccgtaa gtagcagcaa gggcaatagt tcttctccaa ccggattggg ccttagtaac 60

aattgtagtt gcgtaactac acttatccgg caatagctc acctgcacct acgaattctt 120

20

<210> 31

<211> 120

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador para la amplificación de la inserción de pMEL11 (inactivado en GND1)

<400> 31

gttgataacg gactagcctt attttaactt gctatttcta gctctaaaac tcggatttag 60

30

cagagatgga gatcatttat ctttcaactgc ggagaagttt cgaacgccga aacatgcgca 120

<210> 32

<211> 79

<212> ADN

ES 2 767 728 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación del casete de integración (gndA, 6pgdh, gox1705)

5

<400> 32

taaacctgta ttggtgccat tacagaaaa agccactttc tatacaaaaa ctacaataaa 60

gcgataccct gcgatcttc 79

10

<210> 33

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador para la amplificación del casete de integración (gndA, 6pgdh, gox1705)

<400> 33

gatatggata tccttgctca ctggcaagtt gtcagaagca cattctggca acactctgaa 60

20

cgcgcagatt agcgaagc 78

<210> 34

<211> 20

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la confirmación de la integración de gndA

30

<400> 34

aagaagaggt gcttggtgg 20

<210> 35

<211> 20

35

<212> ADN

ES 2 767 728 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la confirmación de la integración de gndA

5

<400> 35

tccaaacctt cagcgaaagc 20

<210> 36

10

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Cebador para la confirmación de la integración de 6pgdh

<400> 36

cgacgtaga agaggaagg 20

20

<210> 37

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador para la confirmación de la integración de 6pgdh

<400> 37

ccttcgggtc ttggaatgtc 20

30

<210> 38

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador para la confirmación de la integración de gox1705

ES 2 767 728 T3

<400> 38

ggacgacgtt agaagatctg 20

<210> 39

5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Cebador para la confirmación de la integración de gox1705

<400> 39

gtattcagcg gtttccttgg 20

15

<210> 40

<211> 120

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador para el oligonucleótido de reparación (inactivado en ALD6)

<400> 40

tagaagaaaa aacatcaaga aacatcttta acatacacia acacatacta tcagaataca 60

25

tgtaccaacc tgcatttctt tccgtcatat acacaaaata ctttcatata aacttacttg 120

<210> 41

<211> 120

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de reparación (inactivado en ALD6)

35

<400> 41

ES 2 767 728 T3

```

caagtaagtt tatatgaaag tattttgtgt atatgacgga aagaaatgca ggttggtaca    60
tgtattctga tagtatgtgt ttgtgatgt taaagatggt tcttgatggt ttttcttcta    120

```

<210> 42

<211> 120

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación de la inserción de pMEL11 (que se dirige a ALD6)

10

<400> 42

```

gttgataacg gactagcctt attttaactt gctatttcta gctctaaaac aattcagagc    60
tgtagccat gatcatttat ctttcaactgc ggagaagttt cgaacgccga aacatgccga    120

```

15 <210> 43

<211> 80

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador para la amplificación del casete de integración (eutE)

<400> 43

```

gtattttggt agattcaatt ctctttccct ttccttttcc ttcgctcccc ttccttatca    60
cacaggaaac agctatgacc                                                    80

```

25

<210> 44

<211> 80

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación del casete de integración (eutE)

ES 2 767 728 T3

<400> 44

ataactgtag taatgttact agtagtagtt gtagaacttg tgtataatga taaattggtt 60

gccgcaaatt aaagccttcg 80

5 <210> 45

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador para la confirmación de la integración de eutE

<400> 45

cgaacaagtt gtcaaggctg 20

15

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador para la confirmación de la integración de eutE

<400> 46

25 gcatcgacca aaacacaacg 20

<210> 47

<211> 464

<212> PRT

30 <213> Escherichia coli

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de oxidorreductasa de E.coli de (eutE de Escherichia coli)

35 <400> 47

ES 2 767 728 T3

Met Asn Gln Gln Asp Ile Glu Gln Val Val Lys Ala Val Leu Leu Lys
1 5 10 15
Met Gln Ser Ser Asp Thr Pro Ser Ala Ala Val His Glu Met Gly Val
20 25 30
Phe Ala Ser Leu Asp Asp Ala Val Ala Ala Lys Val Ala Gln Gln
35 40 45
Gly Leu Lys Ser Val Ala Met Arg Gln Leu Ala Ile Ala Ala Ile Arg
50 55 60
Glu Ala Gly Glu Lys His Ala Arg Asp Leu Ala Glu Leu Ala Val Ser
65 70 75 80
Glu Thr Gly Met Gly Arg Val Glu Asp Lys Phe Ala Lys Asn Val Ala
85 90 95
Gln Ala Arg Gly Thr Pro Gly Val Glu Cys Leu Ser Pro Gln Val Leu
100 105 110
Thr Gly Asp Asn Gly Leu Thr Leu Ile Glu Asn Ala Pro Trp Gly Val
115 120 125
Val Ala Ser Val Thr Pro Ser Thr Asn Pro Ala Ala Thr Val Ile Asn
130 135 140
Asn Ala Ile Ser Leu Ile Ala Ala Gly Asn Ser Val Ile Phe Ala Pro
145 150 155 160
His Pro Ala Ala Lys Lys Val Ser Gln Arg Ala Ile Thr Leu Leu Asn
165 170 175
Gln Ala Ile Val Ala Ala Gly Gly Pro Glu Asn Leu Leu Val Thr Val
180 185 190
Ala Asn Pro Asp Ile Glu Thr Ala Gln Arg Leu Phe Lys Phe Pro Gly
195 200 205
Ile Gly Leu Leu Val Val Thr Gly Gly Glu Ala Val Val Glu Ala Ala
210 215 220
Arg Lys His Thr Asn Lys Arg Leu Ile Ala Ala Gly Ala Gly Asn Pro
225 230 235 240
Pro Val Val Val Asp Glu Thr Ala Asp Leu Ala Arg Ala Ala Gln Ser
245 250 255
Ile Val Lys Gly Ala Ser Phe Asp Asn Asn Ile Ile Cys Ala Asp Glu
260 265 270
Lys Val Leu Ile Val Val Asp Ser Val Ala Asp Glu Leu Met Arg Leu
275 280 285
Met Glu Gly Gln His Ala Val Lys Leu Thr Ala Glu Gln Ala Gln Gln
290 295 300
Leu Gln Pro Val Leu Leu Lys Asn Ile Asp Glu Arg Gly Lys Gly Thr
305 310 315 320
Val Ser Arg Asp Trp Val Gly Arg Asp Ala Gly Lys Ile Ala Ala Ala
325 330 335
Ile Gly Leu Lys Val Pro Gln Glu Thr Arg Leu Leu Phe Val Glu Thr
340 345 350
Thr Ala Glu His Pro Phe Ala Val Thr Glu Leu Met Met Pro Val Leu
355 360 365
Pro Val Val Arg Val Ala Asn Val Ala Asp Ala Ile Ala Leu Ala Val
370 375 380
Lys Leu Glu Gly Gly Cys His His Thr Ala Ala Met His Ser Arg Asn
385 390 395 400
Ile Glu Asn Met Asn Gln Met Ala Asn Ala Ile Asp Thr Ser Ile Phe
405 410 415
Val Lys Asn Gly Pro Cys Ile Ala Gly Leu Gly Leu Gly Gly Glu Gly
420 425 430
Trp Thr Thr Met Thr Ile Thr Thr Pro Thr Gly Glu Gly Val Thr Ser
435 440 445
Ala Arg Thr Phe Val Arg Leu Arg Arg Cys Val Leu Val Asp Ala Phe
450 455 460

<210> 48

5 <211> 366

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

ES 2 767 728 T3

<223> Secuencia de aminoácidos de glicerol deshidrogenasa de E. coli (gldA de Escherichia coli)

<400> 48

```

Met Asp Arg Ile Ile Gln Ser Pro Gly Lys Tyr Ile Gln Gly Ala Asp
1      5      10      15
Val Ile Asn Arg Leu Gly Glu Tyr Leu Lys Pro Leu Ala Glu Arg Trp
      20      25      30
Leu Val Val Gly Asp Lys Phe Val Leu Gly Phe Ala Gln Ser Thr Val
      35      40      45
Glu Lys Ser Phe Lys Asp Ala Gly Leu Val Val Glu Ile Ala Pro Phe
      50      55      60
Gly Gly Glu Cys Ser Gln Asn Glu Ile Asp Arg Leu Arg Gly Ile Ala
      65      70      75      80
Glu Thr Ala Gln Cys Gly Ala Ile Leu Gly Ile Gly Gly Gly Lys Thr
      85      90      95
Leu Asp Thr Ala Lys Ala Leu Ala His Phe Met Gly Val Pro Val Ala
      100      105      110
Ile Ala Pro Thr Ile Ala Ser Thr Asp Ala Pro Cys Ser Ala Leu Ser
      115      120      125
Val Ile Tyr Thr Asp Glu Gly Glu Phe Asp Arg Tyr Leu Leu Leu Pro
      130      135      140
Asn Asn Pro Asn Met Val Ile Val Asp Thr Lys Ile Val Ala Gly Ala
      145      150      155      160
Pro Ala Arg Leu Leu Ala Ala Gly Ile Gly Asp Ala Leu Ala Thr Trp
      165      170      175
Phe Glu Ala Arg Ala Cys Ser Arg Ser Gly Ala Thr Thr Met Ala Gly
      180      185      190
Gly Lys Thr Gln Ala Ala Leu Ala Leu Ala Glu Leu Cys Tyr Asn Thr
      195      200      205
Leu Leu Glu Glu Gly Glu Lys Ala Met Leu Ala Ala Glu Gln His Val
      210      215      220
Val Thr Pro Ala Leu Glu Arg Val Ile Glu Ala Asn Thr Tyr Leu Ser
      225      230      235      240
Gly Val Gly Phe Glu Ser Gly Gly Leu Ala Ala Ala His Ala Val His
      245      250      255
Asn Gly Leu Thr Ala Ile Pro Asp Ala His His Tyr Tyr His Gly Glu
      260      265      270
Lys Val Ala Phe Gly Thr Leu Thr Gln Leu Val Leu Glu Asn Ala Pro
      275      280      285
Val Glu Glu Ile Glu Thr Val Val Ala Ala Leu Ser His Ala Val Gly Leu
      290      295      300
Pro Ile Thr Leu Ala Gln Leu Asp Ile Lys Glu Asp Val Pro Ala Lys
      305      310      315      320
Met Arg Ile Val Ala Glu Ala Ala Cys Ala Glu Gly Glu Thr Ile His
      325      330      335
Asn Met Pro Gly Gly Ala Thr Pro Asp Gln Val Tyr Ala Ala Leu Leu
      340      345      350
Val Ala Asp Gln Tyr Gly Gln Arg Phe Leu Gln Glu Trp Glu
      355      360      365

```

5

<210> 49

<211> 912

10

<212> ADN

<213> Methylobacillus flagellatus

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de gndA (6-fosfogluconato deshidrogenasa)

ES 2 767 728 T3

<400> 49

```

atgaagttgg ctattattgg tttgggtaag atgggtggta acatggctag aagattgttg      60
aagcacggta ttgaagttgt tggtttcgac ttcaaccaag acgctggtta ccaaatttct      120
ttgaccaacg gtatgattcc agcttcttct gttgaagacg ctgtttctaa gttgtctggt      180
gaaccaagaa agattgtttg gattatgttg ccatctggtg acattaccga aaaccaaat      240
aaggacttgg ttccattggt gtctaagggt gacattattg ttgacgggtg taactctaac      300
tacaagcact ctcaaagaag aggtgcttgg ttggtgaac acggtattga attcattgac      360
tgtggtacct ctggtggtat ttggggtttg gacaacgggt actgtttgat gtacgggtgg      420
tctaaggacg ctgctgacgc tgttgttcca attatgcaag ctttggtca cgctgacaga      480
ggttgggctc acgttgggtcc agttggttct ggtcacttca ccaagatgat tcacaacgg      540
attgaatacg gtatgatgca agctttcgct gaaggtttg acttgttgaa gggtaaggaa      600
gaattcaact tggacttggc tcaaattacc gaattgtgga gacacggttc tgttgttaga      660
tcttggttgt tggacttgac cgctgaagct ttggctcacg accaagaatt gtctgctatt      720
gctccatacg ttgctgactc tgggtgaagg agatggaccg ttggtgaagc tgttgaccaa      780
ggtgttgctg ctccagtttt gaccttggct ttgcaaatga gattcgcttc tcaagaagac      840
accggttact cttacaagtt gttgtctatg atgagaaacg ctttcggtgg tcacgctggt      900
aagaccaagt aa                                                                912

```

5 <210> 50

<211> 999

<212> ADN

<213> Gluconobacter oxidans

10 <220>

<223> Secuencia de nucleótidos de gox1705 (6-fosfogluconato deshidrogenasa)

<400> 50

ES 2 767 728 T3

atgagaattg gtattattgg tttgggtaga atgggtggta acattgctgt tagattgacc 60
 agacacggtc acgacggtgt tgttcacgac agaacctctg aagttaccac ctctgttggt 120
 ggtagatgtg aagctggtag agctacccca gctgacacct tggctgacat ggctaagttg 180
 ttggaaggtg acgaacacag agttgtttgg gttatgttgc cagctggtgc tattaccgaa 240
 gactgtgttc aacaattggg tggtttgttg ggtagagggtg acattattat tgacggtggt 300
 aacacctact acaaggacga cgttagaaga tctgctgaat tggctgaaaa gggatatttct 360
 tacgttgacg ttgtacctc tgggtggtgtt tggggtttgg aaagaggta ctgtatgatg 420
 ttcggtggta ccaaggaaac cgctgaatac attgacccaa ttttctctgc tttggctcca 480
 ggtattggtg acgttccaag aaccccagggt agagacgaag ctggtcacga cccaagagct 540
 gaacaagggt acttgcactg tgggtccagct ggttctggtc acttcgtaa gatggttcac 600
 aacggtattg aatacgggtat gatgcaagct ttcgctgaag gtttcgacat tatgaagtct 660
 aagaactctc caatthtggc tgaaaaggac agattcgaat tgaacatggg tgacattgct 720
 gaagtttga gaagaggttc tgttgtttct tcttggttgt tggacttgac cgctgaagct 780
 ttgaccagat ctgaaacctt gaacgaattc tctggtgaag ttgctgactc tgggtgaaggt 840
 agatggacca ttgaagctgc tattgaagaa gacgttccag ctccagttat gaccgctgct 900
 ttgttcacca gattcagatc tagatctggt aacaacttcg ctgaaaagat tttgtctgct 960
 caaagattcg gtttcggtgg tcacgttgaa aagaagtaa 999

<210> 51

<211> 999

5

<212> ADN

<213> Bradyrhizobium sp.

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de 6pgdh (6-fosfogluconato deshidrogenasa

10

<400> 51

atgcaattgg gtatgattgg tttgggtaga atgggtggta acattgtag aagattgatg 60
 agacacggtc actctaccgt tgtttacgac aaggacgcta aggctgttgc tggtttggt 120
 gctgacggtg ctgttggttc tgctaccttg gaagaattcg ttgctaagtt ggaaagacca 180
 agaaccgctt gggttatggt gccagctggt agaattaccg aaaccacat tgacaccatt 240
 gctggtgta tgcaagaagg tgacgttatt attgacgggtg gtaaacctt ctggcaagac 300

ES 2 767 728 T3

gacgtagaa gagtaaggc tttgaaggct agaggatttc actacgtaga cgttggtacc 360
 tctggtggtg tttggggttt ggacagagggt tactgtatga tgattggtgg tgaaaagcaa 420
 gttgtagaca gattggaccc aattttcgct gctttggctc cagggtgctgg tgacattcca 480
 agaaccgaag gtagagaagg tagagaccca agaattgaac aaggttacat tcacgctggt 540
 ccagttggtg ctggtcactt cgtaagatg attcacaacg gtattgaata cggtttgatg 600
 caagcttacg ctgaagggtt cgacattttg aagaacgcta acattgacgc tttgccagct 660
 gaccacagat acgacttoga cttggctgac attgctgaag tttggagaag aggttctggt 720
 attccatctt ggttgttga cttgacctct accgctttgg ctgactctcc agctttggct 780
 gaatactctg gtttcgtaga agactctggt gaaggtagat ggaccgtaa cgctgctatt 840
 gacgaagctg ttccagctga agttttgacc gctgctttgt acaccagatt cagatctaga 900
 aaggaacaca ccttcgctga aaagattttg tctgctatga gagctggttt cggtaggtcac 960
 aaggaaccaa agcaaccagg tgcttctaag ccaaagtaa 999

<210> 52

<211> 789

5

<212> ADN

<213> Haloferax volcanii

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de azf (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

10

<400> 52

atggaccaac cagttttggt gaccggtgct ggtgtagag ttggtcaagc tattttgggt 60
 cacattggtg acgcttacga ctggagattg ttggacagag aaccattgtc tgacgaaaag 120
 attccagact ctgttgactc taccgaagtt tacgttgctg acgttaccga cgaaaccgct 180
 gttagaaacg ctatggacgg tgttcacgct gttattcact tggctggtga cccaagacca 240
 gaagctccat gggactctgt tttgagaaac aacattgacg gtaccaaca aatgttcgac 300
 gctgctgttg acgttggtgt tgaaaagttc gctttcgctt cttctaacca cgctgttggt 360
 gcttacgaaa ccaccgacag aaccccagac atgtacagac cacaccacga attcagattg 420
 gacggtaccg aattgccaag accatctaac ttgtacggtg tttctaaggc tgctggtgaa 480
 accttgggta gatactacca cgaccaccac gacatttctg ttgttaacgt tagaattggt 540
 aacttgacc caccaccac accaaaggaa tacgaaagag gtcaagctat gtggtgtctc 600
 tacagagact gtggtcactt gttcgaatgt tgtattgaag ctgactacga ctacgaaatt 660
 gtttacggtg tttctgacaa cgacagaaag tactactcta ttgacagagc tagagctggt 720
 ttgggttacg acccacaaga caactctgct gaattcacct tcgaaggtga accattggac 780
 gaagcttaa 789

ES 2 767 728 T3

<210> 53

<211> 1404

<212> ADN

<213> Escherichia coli

5

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos eutE (acetaldéhidó deshidrogenasa acetilante

<400> 53

10

```

atgaaccaac aagatatcga acaagttgtc aaggctgtct tgttgaaaat gcaatcttct      60
gacactccat ctgctgctgt ccacgaaatg ggtgttttcg cttctttgga cgacgctggt      120
gctgctgccca aggttgctca acaaggtttg aaatctgttg ccatgagaca attggccatt      180
gctgccatca gagaagctgg tgaaaagcat gccagagact tggctgaatt ggctgtctcc      240
gaaaccggtg tgggtagagt tgaagacaaa ttcgctaaga acgttgctca agctagaggt      300
actccaggtg tcgaatgttt gtctccacaa gtcttgaccg gtgataatgg tttgactttg      360
attgaaaatg ctccatgggg tgttgttgct tccgtcaccg catctaccaa cccagctgct      420
actgtcatca acaacgccat ctctttgatt gctgtcggta actccgttat cttcgctcca      480
caccagctg ccaagaaggt ttctcaaaga gccatcactc tattgaacca agccattggt      540
gctgctggtg gtccagaaaa cttgttggtc actgttgcca acccagatat cgaaactgct      600
caaagattat tcaagttccc aggtatcggg ctattagtcg tcaactggtg tgaagctggt      660
gttgaagctg ccagaaagca caccaacaag agattgattg ctgctggtgc tggtaaccct      720
cctgtttgtg tcgatgaaac cgctgatttg gccagagctg ctcaatccat tgtcaagggt      780
gcttctttcg acaacaacat catctgtgct gacgaaaagg ttttgattgt tgttgactcc      840
gttgctgacg aattgatgag attgatggaa ggtcaacatg ccgtcaagtt gactgctgaa      900
caagctcaac aattgcaacc agttttgttg aagaacatcg atgaaagagg taagggtacc      960
gtctccagag actgggttgg tagagatgct ggtaaagattg ctgctgccat cggtttgaag     1020
gttccacaag aaaccagatt attattcgtc gaaaccaccg ctgaacaccc atttgetgtc     1080
actgaattga tgatgccagt cttaccagtt gtccgtggtg ctaacgttgc tgacgctatt     1140
gctttggctg tcaaattgga aggtggttgt caccacactg ctgccatgca ctccagaaac     1200
atcgaaaaca tgaaccaaat ggctaacgcc attgacactt ccatctttgt caagaacggt     1260
ccatgtatcg ctggtttggg tttgggtggt gaaggttggg ccaccatgac catcaccacc     1320
ccaactggtg aaggtgtcac ttctgccaga actttcgtca gattacgtcg ttgtgttttg     1380
gtcgatgctt tcagaattgt ttaa                                             1404

```

REIVINDICACIONES

1. Una célula eucariota que es naturalmente capaz de fermentación alcohólica que se modifica genéticamente, que comprende uno o más genes heterólogos que codifican:
- 5 a) D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y/o
b) 6-fosfogluconato deshidrogenasa; y/o
c) glucosa deshidrogenasa, gluconolactonasa y gluconato cinasa,
en donde a), b) y glucosa deshidrogenasa en c) son dependientes de NAD⁺.
2. Una célula eucariota según la reivindicación 1 que está genéticamente modificada, que comprende uno o más genes heterólogos que codifican:
- 10 a) D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y/o
b) 6-fosfogluconato deshidrogenasa;
en donde a) y b) son dependientes de NAD⁺.
3. La célula eucariota según la reivindicación 1 o 2, que comprende:
- 15 d) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ (E.C. 1.2.1.10) heteróloga y
e) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una acetil-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.1) homóloga o heteróloga; y opcionalmente,
g) una modificación que conduce a la reducción de la actividad de glicerol-3-fosfato fosfohidrolasa (E.C. 3.1.3.21) y/o h) de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.8 o E.C. 1.1.5.3), nativa en la célula eucariota.
- 20 4. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde
f) se altera una acetaldehído deshidrogenasa-6 (ALD6).
5. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa nativa en la célula eucariota se sustituye por la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa NAD⁺ heteróloga y/o en donde la 6-fosfogluconato deshidrogenasa nativa en la célula eucariota se sustituye por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa NAD⁺ heteróloga.
- 25 6. La célula eucariota según la reivindicación 5, en donde los genes nativos son parte de la vía de la pentosa-fosfato que son dependientes de NADP⁺ y se eligen del grupo: GND1, GND2 y ZWF1.
7. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el uno o más genes heterólogos codifican una D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, o al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO: 8.
- 30 8. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde los genes heterólogos codifican 6-fosfogluconato deshidrogenasa que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, o al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.
9. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la célula eucariota es una célula de levadura, preferentemente una célula de *Saccharomyces* o célula de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 35 10. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la célula eucariota comprende una alteración de uno o más de los genes gpp1, gpp2, gpd1 y gpd2 nativos en la célula eucariota.
11. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la célula eucariota comprende:
- i) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5) heteróloga.
- 40 12. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la célula eucariota comprende además:
j) una o más secuencias de nucleótidos que codifican una glicerol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.6) heteróloga.
13. La célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la célula eucariota es una célula eucariota fermentadora de pentosa y glucosa que es capaz de consumo simultáneo anaerobio de pentosa y glucosa.
- 45

14. Uso de la célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 en la fermentación en la industria de los bicombustibles.
- 5 15. Proceso para la fermentación de un sustrato para producir un producto de fermentación con una célula eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14, en la industria de los bicombustibles, en donde el consumo de acetato se eleva al menos 10 %, al menos 20 %, o al menos 25 % con respecto a la fermentación correspondiente con célula eucariota no mutante.
16. Proceso según la reivindicación 15, en donde el producto de fermentación es etanol y el rendimiento del etanol es al menos aproximadamente 0,5 %, o al menos 1 % superior al de un proceso con la célula eucariota no mutante correspondiente.
- 10 17. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en donde se cofermentan pentosa y glucosa.
18. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde se fermenta un hidrolizado de material lignocelulósico, preferentemente un hidrolizado enzimático de material lignocelulósico.
19. Proceso según la reivindicación 18, en donde el hidrolizado comprende acetato.

Fig. 1

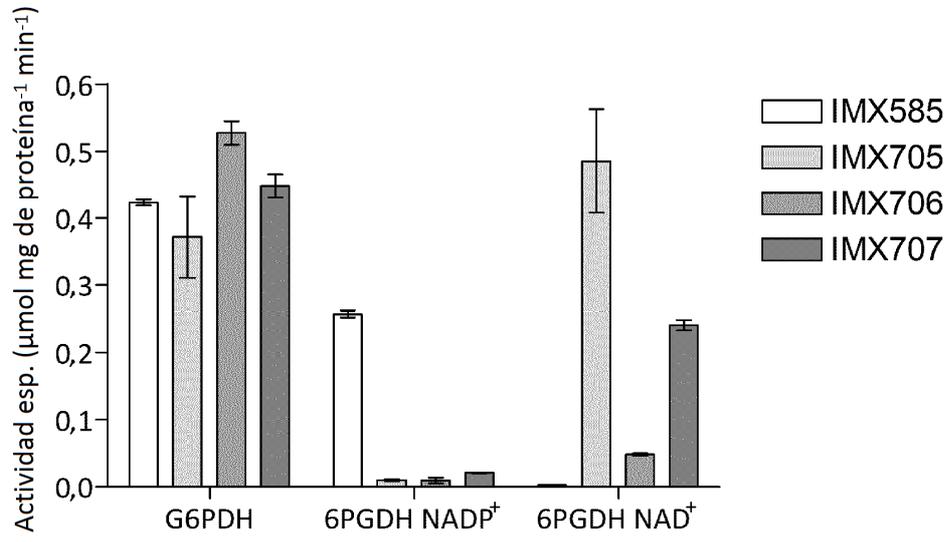


Fig 2A

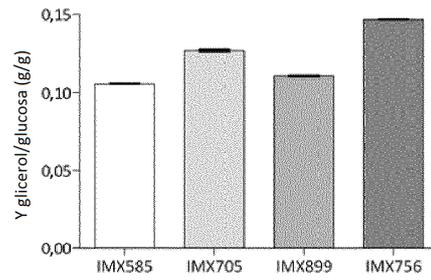
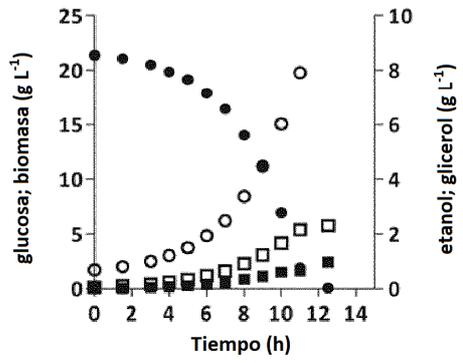
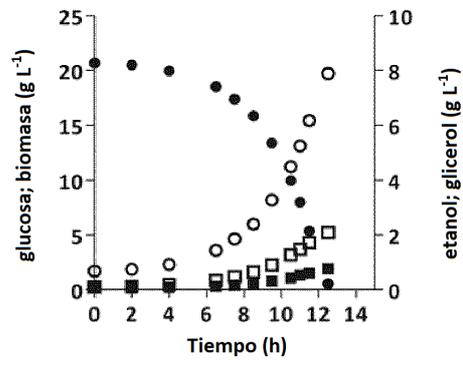


Fig. 2B

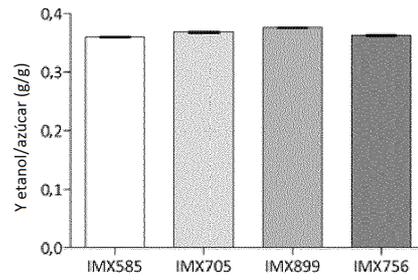
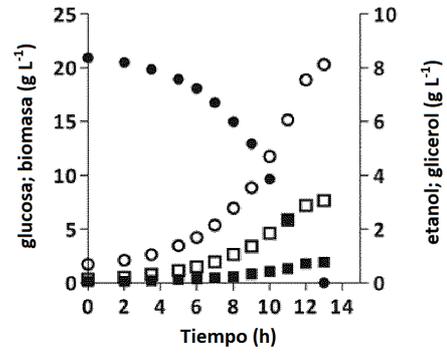
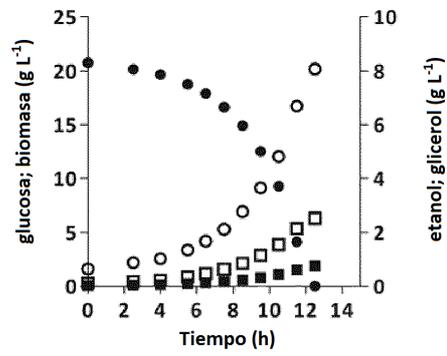


Fig. 3A

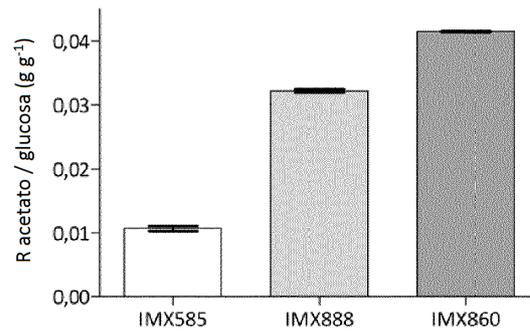
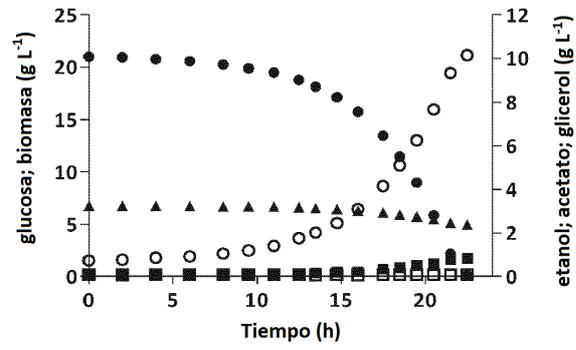
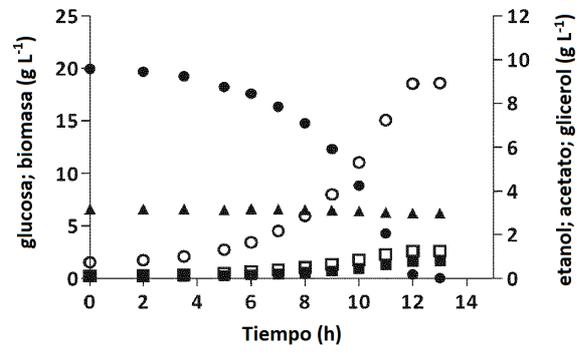


Fig.3B

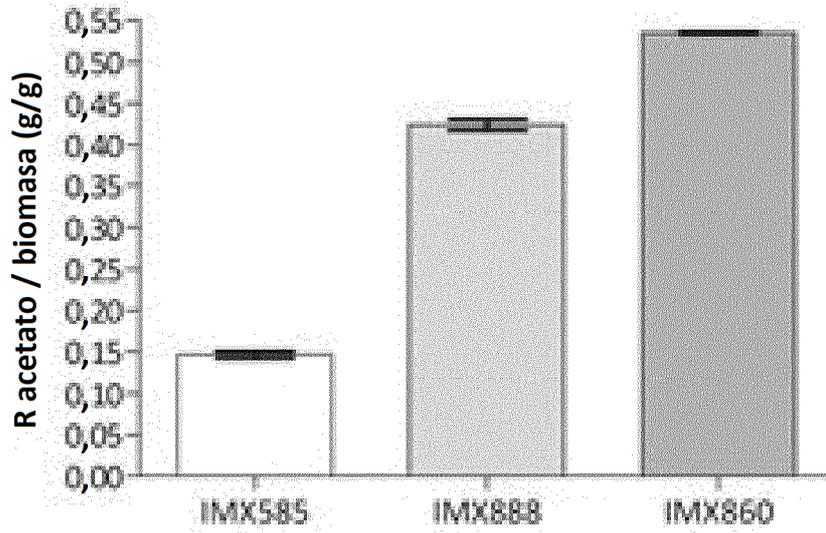
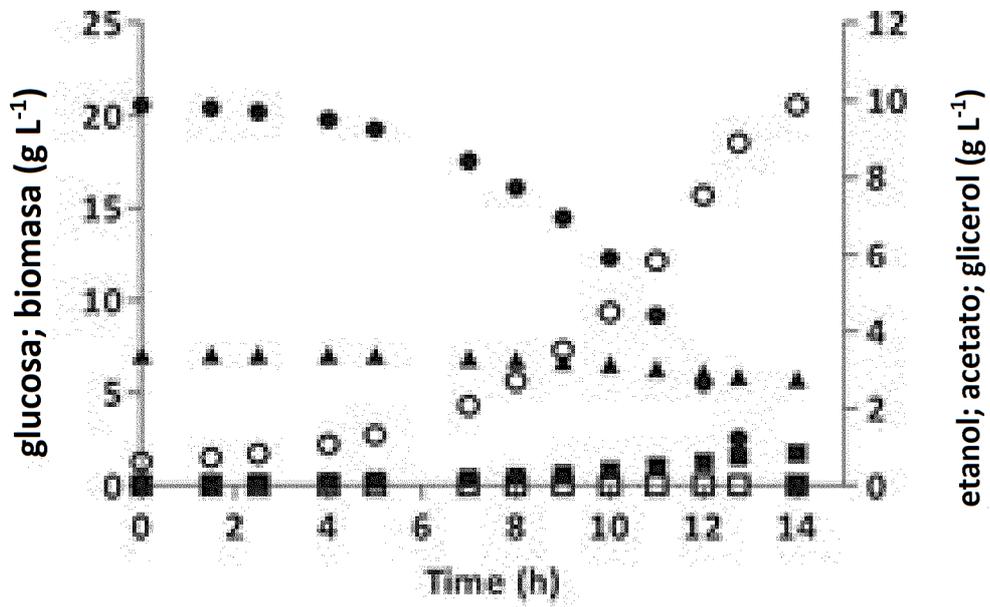


Fig. 4

