

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 639**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 9/92 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015 PCT/BR2015/050075**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15188244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015 E 15806997 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3165609**

54 Título: **Cartucho de expresión para la transformación de una célula eucariótica, método para transformar una célula eucariótica, organismo genéticamente modificado, y procedimiento para la producción de biocombustibles y/o compuestos bioquímicos y biocombustibles producidos de ese modo**

30 Prioridad:
12.06.2014 BR 102014014407

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2020

73 Titular/es:
**BIOCELERE AGROINDUSTRIAL LTDA. (100.0%)
Av. Pierre Simon de Laplace 965A
13069-320 Campinas, BR**

72 Inventor/es:
**DOS SANTOS, LEANDRO VIEIRA y
PEREIRA, GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES**

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 773 639 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

5 Cartucho de expresión para la transformación de una célula eucariótica, método para transformar una célula eucariótica, organismo genéticamente modificado, y procedimiento para la producción de biocombustibles y/o compuestos bioquímicos y biocombustibles producidos de ese modo

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a biocombustibles, compuestos bioquímicos y a procedimientos para obtenerlos. Más específicamente, la presente invención proporciona soluciones técnicas para producir combustibles de segunda generación basados en la conversión de biomasa vegetal, preferiblemente a partir de polímeros de la pared celular vegetal. Entre otros objetos, la presente tecnología describe un casete de expresión para transformar células eucarióticas y microorganismos genéticamente modificados, con un rendimiento fermentativo eficaz en la conversión de azúcares presentes en la biomasa vegetal en compuestos bioquímicos y/o biocombustibles. El microorganismo 15 de la presente invención pasó por el procedimiento de mejora por medio de ingeniería evolutiva con el fin de aumentar su consumo de xilosa, favoreciendo así su rendimiento a escala industrial. También se describe un procedimiento para obtener biocombustibles y/o compuestos bioquímicos y los productos así obtenidos.

Antecedentes de la invención

20 La necesidad de reemplazar la matriz mundial de combustibles basados en fuentes fósiles por alternativas renovables hizo que la producción de combustibles de segunda generación, por ejemplo, el etanol, sea una de las tecnologías más prometedoras en fase de desarrollo. Este procedimiento consiste en la conversión de polímeros que forman la biomasa vegetal, principalmente aquellos presentes en la pared celular tales como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, en biocombustibles y/o compuestos bioquímicos.

30 La biomasa vegetal es una mezcla compleja de compuestos químicamente distintos que se pueden fraccionar generando componentes con aplicaciones específicas. Por lo tanto, de la misma manera que una refinería petroquímica produce una gran variedad de productos derivados del petróleo bruto, se pueden aplicar los mismos principios a las biorrefinerías, es decir, a las refinerías basadas en biomasa (Santos, L. V.; Pereira, G. A. G. Petroquímica verde - Anais do Simpósio Microorganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos. Editora Embrapa. ISSN 2177-4439, 2013).

35 Aunque el uso de biomasa vegetal como fuente de azúcares fermentables es una alternativa prometedora y sostenible, deben superarse algunos desafíos, tales como la disponibilidad de azúcar de la pared celular vegetal. Este procedimiento se puede realizar a través de la acción de enzimas hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas), que proporcionan los monómeros de azúcares (hexosas y pentosas) que son metabolizados posteriormente por microorganismos para generar compuestos bioquímicos y biocombustibles.

40 Sin embargo, los microorganismos naturalmente capaces de consumir azúcares presentes en las cadenas de celulosa y hemicelulosa, generalmente, no se pueden utilizar de manera eficaz a escala industrial. Por lo tanto, es necesario desarrollar microorganismos con capacidad para utilizar eficazmente estos azúcares de la pared celular vegetal a escala industrial, como se describe en la presente invención.

45 Se describe ampliamente el uso de microorganismos como plataformas eficaces en la conversión de azúcar de biomasa en productos de alto valor añadido. En este sentido, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha recibido un papel destacado debido a su robustez y tolerancia en condiciones de fermentación industrial. La facilidad de manipulación genética de este organismo y el uso de herramientas de ingeniería metabólica, en sinergia con la biología de sistemas y la biología sintética, ha permitido la inclusión de nuevas rutas metabólicas para producir 50 combustibles y productos químicos tales como el etanol, el biobutanol, el biodiésel, el 1,2-propanodiol, el ácido succínico, el ácido pirúvico, entre otros [Cellular and Molecular Life Sciences, 69(16):2671-90, 2012].

55 Las líneas salvajes de *S. cerevisiae* no son naturalmente capaces de fermentar las pentosas, tales como, por ejemplo, la xilosa, presente en la biomasa. Sin embargo, varios estudios ya han realizado procedimientos de ingeniería metabólica en *S. cerevisiae* a través de la introducción en estos organismos de rutas metabólicas para el consumo de xilosa, centrándose en dos rutas principales: la ruta de la Xilosa Reductasa - Xilitol Deshidrogenasa (XR-XDH) y la ruta de la Xilosa Isomerasa (XI).

60 Entre los estudios realizados, la introducción del gen que codifica la enzima xilosa isomerasa (XI) permite que la cepa presente un mayor rendimiento en la producción de alcohol y/o ácidos que cuando se modifica con otro gen, como por ejemplo, la codificación de genes de xilosa reductasa o xilitol deshidrogenasa, ya que hay menos acumulación de subproductos no deseables, tales como xilitol y glicerol [2004, FEMS Yeast Res. 4:655-664].

La ruta XR-XDH, presente en microorganismos eucariotas, consiste en dos reacciones rédox, donde la xilosa se

reduce a xilitol por la acción de la enzima xilosa reductasa (XR), en una reacción mediada por NADPH/NADH y después, el xilitol se oxida a xilulosa a través de la enzima xilitol deshidrogenasa (XDH), mediada exclusivamente por NAD⁺. El cofactor NADPH se regenera principalmente en la fase oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato, produciendo CO₂. Además, el NAD⁺ se regenera principalmente en la cadena respiratoria, con el O₂ como aceptor final de electrones. A concentraciones limitadas de oxígeno, la reoxidación completa del NAD⁺ no se produce, lo que da como resultado un desequilibrio redox y la acumulación de xilitol, que afecta directamente al rendimiento final de etanol [Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v.12, n.1, pág. 49-59, 2002]. Además del xilitol, otro subproducto formado es el glicerol, debido a la reoxidación del exceso de NADH a través de XDH [FEMS Yeast Research, Delft, v.4, n.6, pág. 655-664, 2004].

La ruta de la xilosa isomerasa (XI), más común en los procariotas, ocurre en una sola etapa, evitando el desequilibrio redox y la formación de subproductos que disminuyen el rendimiento del etanol. Durante varias décadas, los intentos de expresión heteróloga de la bacteria XI en *S. cerevisiae* no tuvieron éxito [Enzyme and Microbial Technology, Amsterdam, v.32, n.2, pág. 252-259, 2003]. En 2003, la expresión funcional en *S. cerevisiae* de una xilosa isomerasa del hongo anaerobio *Piromyces* sp. [FEMS Yeast Research, Delft, v.4, n.1, pág. 69-78, 2003] y en 2009 del hongo *Orpinomyces* sp. [Applied Microbiology and Biotechnology, Heidelberg, v.82, n.6, pág. 1067-1078, 2009], dio como resultado mutantes capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono, con altas actividades de estas enzimas, mayor rendimiento en la producción de etanol, menor producción y acumulación de metabolitos intermedios y menos represión catabólica en el medio que contiene glucosa y xilosa [FEMS Yeast Research, Delft, v.4, n.6, pág. 655-664, 2004; FEMS Yeast Research, Delft, v.5, n.4, pág. 399-409, 2005a; FEMS Yeast Research, Delft, v.5, n.10, pág. 925-934, 2005b]. La ruta XR-XDH tiene una productividad inicial más alta para producir etanol más rápidamente, solo con la inserción de los genes responsables de la conversión de xilosa, sin embargo, la ruta XI tiene un mayor rendimiento para no acumular subproductos [Microbial Cell Factories, Londres, v.6, n.5, pág. 1-10, 2007].

Muchos documentos, como, por ejemplo, WO2006/009434, WO2011/153516, US8399215, EP2679686 y WO2014018552 describen microorganismos capaces de utilizar pentosas, más específicamente xilosa, como fuente de carbono. Para poder consumir xilosa, es necesario que el microorganismo se modifique genéticamente al menos con la adición del gen que codifica la xilosa isomerasa. Como estrategia para mejorar la productividad de la levadura, los genes que codifican la Xiluloquinasa y los genes de la ruta de las pentosas fosfato se pueden expresar en exceso: Transcetolasa, ribosa 5-fosfato isomerasa, ribosa 5-fosfato epimerasa y Transaldolasa. Además, se puede llevar a cabo la inactivación del gen que codifica una aldosa reductasa (*GRE3*), con el objetivo de una menor acumulación de xilitol y un mayor rendimiento de etanol.

El documento WO2009/109633 describe una célula que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa en donde la secuencia de nucleótidos es heteróloga para el anfitrión. Se puede utilizar una célula en un procedimiento para producir un producto de fermentación, tal como el etanol. Tal procedimiento puede comprender la fermentación de un medio que contiene una fuente de xilosa con una célula de la invención de tal manera que la célula fermenta xilosa al producto de fermentación. Por otro lado, documento WO2009/109633 no describe un casete de expresión o el microorganismo modificado genéticamente como se describe en la presente invención.

El documento WO99/54477 describe unos vectores de expresión modificados genéticamente y células recombinantes que comprenden esos vectores, o porciones de esos vectores. Los vectores comprenden una forma mutante de un gen que codifica una enzima aldosa reductasa (AR) en la que solo una parte del gen está presente en el vector. La secuencia de la aldosa reductasa mutada sirve como un sitio para el cruce homólogo de secuencias codificadas por vectores y un genoma de la célula anfitriona. Las células recombinantes elaboradas utilizando el vector carecen de un gen de aldosa reductasa y son capaces de fermentar productos hidrolizados de lignocelulosa en etanol en grandes cantidades. El documento también proporciona vectores y células recombinantes con múltiples copias de genes que codifican enzimas involucradas en la conversión de lignocelulosa o productos hidrolizados de lignocelulosa a etanol. El documento también proporciona métodos para elaborar células recombinantes y métodos para producir etanol eficazmente a partir de composiciones que contienen lignocelulosa. Por otro lado, documento WO99/54477 no describe un casete de expresión o el microorganismo modificado genéticamente como se describe en la presente invención.

Por lo tanto, la literatura muestra que es necesaria una mayor expresión de los genes descritos anteriormente que favorecen la conversión de xilosa en etanol para que el consumo de este azúcar sea eficaz. Por lo tanto, los microorganismos descritos en la técnica anterior, que fueron modificados genéticamente para el consumo de xilosa, pueden tener (pero no necesariamente) las modificaciones genéticas descritas anteriormente. Lo que básicamente diferencia la eficacia y la productividad en la conversión anaeróbica de xilosa en biocombustibles y/o compuestos bioquímicos presentados por cada uno de estos es la forma y la ubicación en la que estos genes se incorporan al genoma del microorganismo, considerando la mejor combinación posible entre estos genes y los respectivos promotores por los que están regulados, así como la elección apropiada por la secuencia de nucleótidos que codifican la xilosa isomerasa, siendo este el gen principal que, cuando se expresa, permite el consumo de xilosa

para cada microorganismo modificado, además de la adaptación del microorganismo a través de la evolución. Por lo tanto, la presente invención muestra ventajosamente un mejor rendimiento y productividad que los microorganismos descritos previamente en la técnica anterior.

5 La presente invención describe, entre otros objetos, un microorganismo modificado genéticamente para la inclusión de genes de la ruta de la pentosa fosfato, así como los de la Xiluloquinasa, y la inactivación del gen de la aldosa reductasa, como se describe en los documentos WO2006/009434, WO2011/153516, US8399215, EP2679686 y WO2014018552. El microorganismo modificado genéticamente de la presente invención difiere ventajosamente del anterior por el hecho de que los genes se han combinado de manera más eficaz con sus promotores, así como se han insertado en ubicaciones más convenientes en el genoma del microorganismo, en comparación con los documentos mencionados anteriormente. Además, los codones del gen que codifica la xilosa isomerasa insertado en la presente memoria han sido optimizados, por los autores de la presente invención, preferiblemente para los microorganismos en los que se insertó por primera vez, en este caso, el microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. En el presente documento, los genes se insertan en el microorganismo a través de la recombinación homóloga, y interactuando a continuación con su genoma.

Específicamente, con respecto a la producción de etanol, la obtención de algunas líneas capaces de actuar a escala industrial fue satisfactoria. Sin embargo, tales cepas aún son susceptibles de que su rendimiento fermentativo se vea comprometido o incluso reemplazado por líneas salvajes cuando se someten a las condiciones estresantes del procedimiento brasileño de producción de etanol.

En el procedimiento de fermentación brasileño para la producción de etanol, es habitual que las plantas vuelvan a utilizar las células de levadura empleadas en la fermentación, un procedimiento conocido como reciclaje. En este procedimiento, se puede reutilizar hasta 90% de las levaduras de una fermentación a otra, lo que da como resultado densidades celulares muy altas dentro del fermentador y hace que el tiempo de fermentación sea muy corto [FEMS yeast research, 8 (7): 1155-63, 2008].

En algunas plantas industriales, el reciclaje puede ocurrir durante todo el período de cosecha, que dura hasta nueve meses. Por lo tanto, el período prolongado de reciclaje añadido a la entrada continua de contaminantes microbianos en el sistema, hace que el ambiente de fermentación sea altamente competitivo, imponiendo graves tensiones bióticas y abióticas en las cepas de levadura utilizadas en el procedimiento [International Sugar Journal, Londres, v.112, pág. 86-89, 2010]. Este entorno competitivo da como resultado el reemplazo de levaduras que iniciaron el procedimiento de fermentación por levaduras salvajes. Este hecho ocurre porque las levaduras salvajes existen naturalmente en la caña de azúcar y, por lo tanto, se insertan junto con ella en el procedimiento de fermentación, lo que termina contaminando todo el procedimiento industrial [FEMS yeast research, 8(7):1155-63, 2008].

Adicionalmente, algunos estudios demostraron que las levaduras que comenzaron el procedimiento de fermentación y terminaron siendo reemplazadas por las salvajes, tampoco pueden sobrevivir a situaciones estresantes del procedimiento industrial de fermentación, tal como una alta concentración de etanol, alta temperatura, estrés osmótico debido a sales y azúcares, acidez, sulfitos y contaminación bacteriana [FEMS yeast research, 8(7): 1155-63, 2008]. Por lo tanto, la obtención de una línea con capacidad eficaz de resistencia al procedimiento industrial agresivo de fermentación, así como susceptible de modificaciones genéticas para adquirir características de interés, tales como el consumo de pentosas, más específicamente xilosa, no es un procedimiento trivial.

El microorganismo descrito en la presente invención, por lo tanto, se adapta ventajosamente al procedimiento brasileño de fermentación industrial y se muestra que es diferencialmente eficaz en la conversión de azúcares de biomasa vegetal, principalmente material lignocelulósico, en biocombustibles y/o compuestos bioquímicos, es decir, con rendimiento suficiente para ser aplicado a escala industrial, incluso bajo las condiciones estresantes del procedimiento de fermentación brasileño. Además, el microorganismo descrito en la presente invención muestra características de interés industrial, por ejemplo: es una cepa no floculante, presenta alto rendimiento de etanol, baja formación de glicerol y xilitol, alta viabilidad, alta tasa de crecimiento, sin producción de espuma, entre otras.

Breve descripción de la invención

55 La presente invención proporciona un casete de expresión para transformar una célula eucariótica caracterizada porque comprende: una combinación de los siguientes casetes de expresión: página 7a

La presente invención proporciona un procedimiento para transformar una célula eucariótica que comprende la introducción, en la célula a transformar, de al menos un casete de expresión como se define en la presente invención.

La presente invención proporciona un microorganismo modificado genéticamente que comprende al menos un casete de expresión como se define por la presente invención.

a) un casete de expresión que comprende el gen que codifica la xilosa isomerasa de secuencia SEQ ID NO: 1, el promotor TDH1 de secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 y el terminador TDH1 de secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3;

b) un casete de expresión que comprende el promotor ADH1 representado por la secuencia SEQ ID NO: 8, el gen XKS1 representado por la secuencia SEQ ID NO: 9 y el terminador ADH1 representado por la secuencia SEQ ID NO: 10;

c) un casete de expresión que comprende el promotor TDH1 de secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2, el gen TAL1 de secuencia SEQ ID NO: 5, el gen terminador TDH1 de secuencia SEQ ID NO: 3, seguido por el promotor PGK1 de secuencia SEQ ID NO: 6, del gen RK11 (SEQ ID NO: 7) y el terminador de secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 13; y

d) un casete de expresión que comprende el promotor TDH1 de secuencia SEQ ID NO: 02, el gen TKL1 de secuencia SEQ ID NO: 11, el gen codificante de la Ribosa 5-Fosfato Epimerasa (SEQ ID NO: 12), el terminador TDH1 de secuencia SEQ ID NO: 3, seguido por el promotor PGK1 de secuencia SEQ ID NO: 6, el gen RPE1 de secuencia SEQ ID NO: 12 y el terminador PGK1 de secuencia SEQ ID NO: 13;

en donde dicho casete de expresión es funcional en la célula eucariótica.

La presente invención proporciona el microorganismo modificado genéticamente *Saccharomyces cerevisiae* DSM28739.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir biocombustibles y/o compuestos bioquímicos que comprende la etapa de cultivo de microorganismos como se define en la presente invención.

La presente invención proporciona un microorganismo modificado genéticamente con un rendimiento fermentativo eficaz en la conversión de azúcares contenidos en biomasa vegetal, en biocombustibles y/o compuestos bioquímicos, en comparación con su versión sin las modificaciones genéticas descritas en el presente documento. Más específicamente, el microorganismo modificado genéticamente descrito en la presente invención se refiere a cualquier célula eucariótica susceptible de transformación genética, que puede consistir en levaduras u hongos filamentosos, preferiblemente levadura del género *Saccharomyces*.

El microorganismo de la invención proporciona un rendimiento eficaz en la conversión de azúcares presentes en la biomasa vegetal, preferiblemente material lignocelulósico, en compuestos bioquímicos y/o biocombustibles. Por lo tanto, en una realización, la presente invención describe un microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae* más eficaz que su correspondiente sin las modificaciones genéticas en la conversión de pentosas presentes en el material lignocelulósico en alcoholes y/o compuestos bioquímicos, tales como, por ejemplo, ácido succínico, ácido málico, 1,3-propanodiol, 1,2-propanodiol, butanol, isobutanol, biodiésel, 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, PHB - poli(hidroxibutirato), no obstante, sin estar restringidos a estos, no obstante sin limitarse al mismo.

El microorganismo de la presente invención se modifica genéticamente mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido con función de xilosa isomerasa. Esta secuencia se describió originalmente en *Orpinomyces* sp. [Appl Microbiol Biotechnol, 82:1067-1078, 2009] (XI, EC 5.3.1.5) y fue sometida manualmente a optimización de los codones utilizados preferiblemente para *Saccharomyces cerevisiae* por los autores de la presente invención. La optimización comprende la comparación entre los codones presentes en la secuencia de *Orpinomyces* con los que se utilizan preferiblemente para *Saccharomyces* con el objetivo de reemplazar los mismos manteniendo, sin embargo, la proporción de codones presentes en *Saccharomyces*. Sin embargo, la secuencia optimizada de xilosa isomerasa descrita en la presente invención (representada en SEQ ID NO: 1) no es natural y es diferente de las secuencias naturales de xilosa isomerasa ya descritas. SEQ ID NO: 1 también puede ser útil para la inserción en células eucarióticas y se puede expresar en su forma activa. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 se puede presentar en una copia única o en copias múltiples en el genoma.

La célula eucariótica anfitriona modificada genéticamente (célula diana) puede contener adicionalmente genes de la ruta de la pentosa fosfato, con el objetivo de aumentar la velocidad de conversión de xilosa. Sin embargo, además de la inserción de SEQ ID NO: 1 en la célula anfitriona, la presente invención describe modificaciones genéticas en la misma célula con el objetivo de favorecer el flujo metabólico a través de la ruta de la pentosa fosfato, sin embargo, estas modificaciones no son un factor restrictivo para la transformación de la célula anfitriona con la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO: 1.

Con el fin de aumentar el flujo de la ruta de pentosas de fosfato en la célula anfitriona, se insertan nuevas copias de los genes que codifican las enzimas Xiluloquinasas (*XKS1*, EC 2.7.1.17), cuya secuencia de nucleótidos está representada en este documento por **SEQ ID NO: 9**, Transaldolasa (*TAL1* EC 2.2.1.2), representada por **SEQ NO ID: 5**, Transcetolasa (*TKL1* EC 2.2.1.1), representada por **SEQ ID NO: 11**, Ribosa 5-fosfato isomerasa (*RK11*, EC 5.3.1.6), representada por **SEQ ID NO: 7**; y Ribosa 5-fosfato epimerasa (*RPE1*, EC 5.1.3.1), representada por **SEQ ID NO: 12**.

Entre las enzimas presentadas y que constituyen la ruta de la pentosa-fosfato, al menos uno de los genes que las codifican se debe expresar en exceso y, preferiblemente, vincularse a promotores constitutivos, es decir, aquellos que se expresan constantemente, independientemente de las condiciones a las que se somete la célula, o promotores naturalmente inducibles. En el presente documento, los promotores se definen como una región reguladora, ubicada en la región 5' del gen bajo su acción y responsable del comienzo de la transcripción, mientras que los terminadores se definen como una secuencia que determina el final del gen durante el procedimiento de transcripción.

La presente invención proporciona adicionalmente casetes de expresión que contienen uno o más genes de enzimas endógenas de la fase no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, para transformar células eucarióticas. Tales casetes de expresión o construcciones génicas comprenden preferiblemente promotores fuertes y constitutivos de la célula en la que se insertarán. Específicamente, se describen en la presente memoria descriptiva cuatro realizaciones de casetes de expresión integradores construidos utilizando promotores fuertes y constitutivos de *Saccharomyces cerevisiae* e integrado de manera estable en el genoma de la célula anfitriona.

Uno de los casetes contiene el gen que codifica la xilosa isomerasa, **SEQ ID NO: 1** y se inserta en la célula anfitriona funcionalmente unida y/o flanqueada, preferiblemente, por la región promotora y terminadora del gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (TDH1). Un segundo casete descrito contiene el gen que codifica la enzima Xiluloquinasa (**SEQ ID NO: 9**) y se construye preferiblemente utilizando el promotor y el terminador del gen que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH1). Un tercer casete de la presente invención contiene genes codificadores de Transaldolasa (**SEQ NO ID: 5**) y Ribosa 5-fosfato isomerasa (**SEQ ID NO: 7**) y se construye, preferiblemente utilizando promotores y terminadores del gen que codifica la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (*TDH1*) para flanquear el gen de la Transaldolasa y los promotores y terminadores de la enzima 3-fosfoglicerato Quinasa (*PGK1*) para flanquear el gen de la Ribosa 5-fosfato isomerasa. El último casete de la presente invención contiene genes codificadores de Transcetolasa (**SEQ ID NO: 11**) y Ribosa 5-fosfato epimerasa (**SEQ ID NO: 7**). Este se construye, preferiblemente, bajo la acción de promotores y terminadores de los genes de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (*TDH1*), flanqueando el gen de la Transcetolasa y el promotor y terminador del gen que codifica la enzima 3-fosfoglicerato quinasa (*PGK1*).

Dichos casetes de expresión con los genes de la ruta metabólica de la pentosa fosfato que favorecen el consumo de xilosa se introducen en la célula eucariótica y los genes respectivos se insertan en el cromosoma diana ubicado entre el centrómero y el primer gen adyacente a él, preferiblemente en la región de los 5 mil primeros pares de bases contados desde el centrómero tanto en dirección *aguas arriba* y *aguas abajo*, que puede ser incluso inmediatamente *aguas arriba*, inmediatamente *aguas abajo* o ambos a la vez.

Además de la inserción de casetes de expresión, la presente invención proporciona la delección del gen *GRE3* de la célula eucariótica anfitriona, que codifica una aldosa reductasa y está representado en **SEQ ID NO: 14**.

Además, la presente invención proporciona la integración estable y en un gran número de copias de casetes que expresan *XI* (**SEQ ID NO: 1**) en el genoma de la célula anfitriona. En el presente documento, se considera un elevado número de copias la inserción de, al menos, 5 copias del gen en cuestión, siendo preferible la inserción de al menos 20 copias.

El presente documento describe, por lo tanto, una célula eucariótica, preferiblemente un microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, modificada genéticamente que contiene en su genoma al menos uno de los genes de las enzimas necesarias para favorecer la parte no oxidativa de las rutas de la pentosa fosfato, insertadas preferiblemente en un gran número de copias y en la región entre el centrómero y su primer gen adyacente.

Además, se describe un microorganismo que, además de la manipulación genética representada anteriormente, se sometió a un procedimiento de ingeniería evolutiva para generar mutaciones aleatorias que favorecen un mayor consumo de la porción lignocelulósica de la biomasa vegetal, preferiblemente xilosa en medio anaeróbico y, en consecuencia, una mayor tasa de crecimiento y una mayor producción de compuestos bioquímicos y/o biocombustibles, preferiblemente etanol, por período de tiempo, en comparación con el microorganismo antes del procedimiento de evolución. El microorganismo modificado genéticamente de la presente invención presenta de manera diferente las características de no floculación, presentación de alto rendimiento de etanol, baja formación de glicerol y xilitol, alta viabilidad, alta tasa de crecimiento, no producción de espuma, además de la capacidad eficaz de resistencia al procedimiento de fermentación agresivo. Este microorganismo evolucionado fue archivado por los autores de la presente invención en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivo Celular - Leibniz-Institut DSMZ, habiendo recibido el número **DSM28739**.

El microorganismo **DSM28739** de la presente invención muestra características de interés industrial tales como: ser una cepa no floculante, presentar alto rendimiento de etanol, baja formación de glicerol y xilitol, alta viabilidad, alta tasa de crecimiento, no producción de espuma, entre otras.

Además, la presente invención proporciona el procedimiento de producción de biocombustibles y compuestos bioquímicos a partir de biomasa vegetal. Más específicamente, el procedimiento para producir biocombustibles y compuestos bioquímicos utiliza preferiblemente la porción lignocelulósica de la biomasa vegetal. El procedimiento de la presente invención utiliza el microorganismo de la invención, preferiblemente DSM28739, para producir biocombustibles y/o compuestos bioquímicos.

Breve descripción de los dibujos

En la Figura 1, se observa el consumo de xilosa y la producción de etanol en condiciones anaerobias por el microorganismo descrito en la presente invención después del procedimiento de manipulación genética para la inserción de genes de la ruta de la pentosa fosfato y el gen genéticamente modificado de la xilosa isomerasa, **SEQ ID NO: 1**, y antes del procedimiento de evolución. En el eje vertical, la concentración se describe en gramos por litro (g/L) y en el eje horizontal, el tiempo en horas. La concentración de xilosa está indicada por (◆), mientras que la concentración de etanol por tiempo, está representada por (■).

En la Figura 2, se observa el consumo de xilosa y la producción de etanol en condiciones anaerobias por el microorganismo descrito en la presente invención después del procedimiento de manipulación genética para la inserción de genes de la ruta de la pentosa fosfato y el gen genéticamente modificado de xilosa isomerasa. **SEQ ID NO: 1**, y después del procedimiento de evolución. En el eje vertical, la concentración se describe en g/L y en el eje horizontal, el tiempo en horas. La concentración de xilosa está indicada por (◆), mientras que la concentración de etanol por tiempo está representada por (■).

En la Figura 3, es posible observar la cinética de fermentación del microorganismo DSM28739 en medio sintético que comprende xilosa como una de sus fuentes de carbono, como YEPX (20 g/L de xilosa, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona bacteriológica). En la figura, el símbolo (■) representa Xilosa, (◆) representa el crecimiento celular expresado en densidad óptica (DO), (▲) representa etanol y (●) representa glicerol. En la figura presentada, el eje vertical a la izquierda representa la concentración (g/L) de cada uno de los compuestos analizados. El eje vertical a la derecha representa la densidad óptica (DO) medida a 600 nm de absorbancia. El eje horizontal, a su vez, representa el tiempo de fermentación, expresado en horas.

En la Figura 4, se observa la cinética de fermentación del microorganismo DSM28739 en el producto hidrolizado de paja de caña, estando representada la concentración en el eje vertical (g/L) y el tiempo en horas en el eje horizontal. La concentración de xilosa por tiempo está representada por (■), la glucosa por (◆), la concentración de etanol está representada por (▲), el glicerol por (●) y ácido acético.

En la Figura 5, se muestra la secuencia de nucleótidos representada como **SEQ ID NO: 17**, indicándose la región que codifica LEU2 (subrayado), junto con su promotor y terminador (no subrayado).

En la Figura 6, se muestra el gel de electroforesis obtenido de la amplificación de regiones externas al casete insertado, confirmando la integración a las levaduras. En la presente figura, M representa la escala del marcador de 1 kb; 1a, el casete del gen XKS1 insertado junto al centrómero 2; 1b, el blanco de la reacción 1; 2a es el casete del gen XKS1 insertado al lado del centrómero 8; 2b es el blanco de la reacción 2; 3a es el casete de genes TAL1 y RKI1 insertado al lado del centrómero 12; 3b es el blanco de la reacción 3; 4a es el casete de genes TKL1 y RPE1 insertados junto al centrómero 13; 4b es el blanco de la reacción 4; 5a es el casete del gen XI insertado junto al centrómero 5; y 5b es el blanco de la reacción 5.

En la Figura 7, extraída de Matsushika et al., [Applied Microbiology and Biotechnology, 84:37-53, 2009], la modificación realizada en *S. cerevisiae* se puede observar a través de la ingeniería metabólica para la fermentación de xilosa. Los genes marcados con asterisco fueron expresados en exceso; los genes cruzados fueron eliminados.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un casete de expresión para transformar una célula eucariótica que comprende una combinación de los siguientes casetes de expresión: Página 14a

- a) un casete de expresión que comprende el gen que codifica la xilosa isomerasa de secuencia **SEQ ID NO: 1**, el promotor TDH1 de la secuencia de nucleótidos **SEQ ID NO: 2**, y el terminador TDH1 de la secuencia de nucleótidos **SEQ ID NO: 3**;
- b) un casete de expresión que comprende el promotor ADH1 representado por la secuencia **SEQ ID NO: 8**, el gen XKS1 representado por la secuencia **SEQ ID NO: 9** y el terminador ADH1 representado por la secuencia **SEQ ID NO: 10**;
- c) un casete de expresión que comprende el promotor TDH1 de secuencia de nucleótidos **SEQ ID NO: 2**, el gen TAL1 de secuencia **SEQ ID NO: 5**, el gen terminador TDH1 de secuencia **SEQ ID NO: 3**, seguido por

promotor PGK1 de secuencia **SEQ ID NO: 6**, del gen RK11 (**SEQ ID NO: 7**) y el terminador de secuencia de nucleótidos **SEQ ID NO: 13**; y

5 d) un casete de expresión que comprende el promotor TDH1 de secuencia **SEQ ID NO: 02**, el gen TKL1 de secuencia **SEQ ID NO: 11**, el gen codificante de la Ribosa 5-fosfato epimerasa (**SEQ ID NO: 7**), el terminador TDH1 de secuencia **SEQ ID NO: 3**, seguido por el promotor PGK1 de secuencia **SEQ ID NO: 6**, el gen RPE1 de secuencia **SEQ ID NO: 12** y el terminador PGK1 de secuencia **SEQ ID NO: 13**;

en donde dicho casete de expresión es funcional en la célula eucariótica.

10 En una realización, dichos uno o más promotores son constitutivos o naturalmente inducibles.

La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para transformar la célula eucariótica que comprende la introducción, en la célula a transformar, de al menos un casete de expresión como revela la presente invención. En una realización, la introducción es en el genoma de la célula a transformar.

15 En una realización, el casete de expresión comprende adicionalmente la inactivación o delección del gen GRE3 (**SEQ ID NO: 14**) en el genoma de dicha célula eucariótica.

20 La presente invención proporciona un microorganismo genéticamente modificado que comprende al menos un casete de expresión como se define en la presente solicitud de patente.

En una realización, uno o más de dichos casetes de expresión están presentes en la región de los 5 mil primeros pares de bases contados desde el centrómero, tanto en dirección *aguas arriba* como *aguas abajo*, que puede ser incluso inmediatamente *aguas arriba*, inmediatamente *aguas abajo* o ambas a la vez.

25 En una realización, las secuencias promotoras, las secuencias codificantes y las secuencias terminadoras de los casetes de expresión son estables en el genoma del microorganismo y/o están presentes en al menos 5 copias en el genoma del microorganismo.

30 En una realización, el gen GRE3 (**SEQ ID NO: 14**) está inactivado o eliminado en/de su genoma.

En una realización, el microorganismo es levadura del género seleccionado del grupo que consiste en: *Saccharomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Hansenula* y *Yarrowia*

35 En una realización, el microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae* DSM28739.

La presente invención proporciona el microorganismo modificado genéticamente. *Saccharomyces cerevisiae* DSM28739.

40 La presente invención proporciona el procedimiento de producción de biocombustibles y/o compuestos bioquímicos que comprende una etapa de cultivo de microorganismos como se define en la presente invención.

45 En una realización, el rendimiento del procedimiento es de al menos 0,45 gramos de etanol producido por gramo de xilosa consumido por microorganismos en el medio sintético que comprende xilosa como fuente de carbono.

En una realización, la productividad volumétrica es de al menos 0,67 gramos de etanol producido por litro cada hora, cuando está en un medio sintético que comprende xilosa como fuente de carbono.

50 En una realización, el microorganismo es el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* DSM28739.

La presente invención proporciona un microorganismo modificado genéticamente con un rendimiento fermentativo eficaz en la conversión de azúcares contenidos en la biomasa vegetal, en biocombustibles y/o compuestos bioquímicos, en comparación con su versión sin las modificaciones genéticas descritas en el presente documento.

55 Más específicamente, el microorganismo modificado genéticamente de la presente invención se refiere a una célula eucariótica genéticamente transformada, preferiblemente levadura u hongos filamentosos.

60 En esta invención, las levaduras se consideran como cualquier sujeto del grupo Eumycotina, es decir, hongos verdaderos, que crecen de forma unicelular y que realizan preferiblemente fermentación anaerobia, tal como, por ejemplo, *Saccharomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Hansenula* y *Yarrowia*

Los hongos filamentosos, a su vez, son aquellos caracterizados por tener micelio vegetativo y crecer a partir de la

elongación hifal, además de realizar respiración aeróbica, tal como, por ejemplo, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Moniliophthora* y *Acremonio*.

5 Incluso más específicamente, la presente invención proporciona un microorganismo modificado genéticamente, preferiblemente levadura del género *Saccharomyces*.

10 El microorganismo descrito presenta un rendimiento eficaz en la conversión de azúcares presentes en la biomasa vegetal, preferiblemente material lignocelulósico, en compuestos bioquímicos o biocombustibles. Una realización de la invención describe un microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae* más eficaz en la conversión de pentosas presentes en el material lignocelulósico en alcoholes y/o compuestos bioquímicos, tales como, por ejemplo, ácido succínico, ácido málico, 1,3-propanodiol, 1,2-propanodiol, butanol, isobutanol, biodiesel, 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, PHB - poli(hidroxibutirato), sin embargo, sin limitarse a estos, en comparación con su versión sin las modificaciones genéticas contenidas en el presente documento.

15 La pentosa utilizada preferiblemente por los microorganismos para la conversión en alcoholes y/o compuestos bioquímicos indicados anteriormente es la xilosa, no obstante, sin limitarse a ella.

20 En la presente invención, se hacen referencias a varias secuencias de genes, todas enumeradas en la sección de Lista de secuencias. Para una breve referencia y facilidad de comprensión, sus funciones o genes respectivos se indican en la siguiente tabla 1.

Tabla 1 - Secuencias a las que se hace referencia en la presente invención y sus respectivos genes/funciones.

Gen/función	Secuencia
Xilosa isomerasa	SEQ ID NO: 1
Promotor de Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (TDH1)	SEQ ID NO: 2
Terminador de Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (TDH1)	SEQ ID NO: 3
URA3 e <i>loxP</i>	SEQ ID NO: 4
Transaldolasa (TAL1)	SEQ ID NO: 5
Promotor de 3-Fosfato quinasa (PGK1)	SEQ ID NO: 6
Ribosa 5-fosfato isomerasa (RKI1)	SEQ ID NO: 7
Promotor de la enzima Alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1)	SEQ ID NO: 8
Xiluloquinasa (XKS1)	SEQ ID NO: 9
Terminador de la Alcohol deshidrogenasa (ADH1)	SEQ ID NO: 10
Transcetolasa (TKL1)	SEQ ID NO: 11
Ribosa 5-fosfato epimerasa (RPE1)	SEQ 10 NO: 12
Terminador de 3-Fosfato quinasa (PGK1)	SEQ ID NO: 13
Aldosa reductasa (GRE3)	SEQ ID NO: 14
Recombinasa CRE	SEQ ID NO: 15
LTR del retrotransposón <i>Ty1</i>	SEQ ID NO: 16
LEU2 (ORF + promotor y terminador)	SEQ ID NO: 17

25 La secuencia de nucleótidos representada por **SEQ ID NO: 1**, que codifica un péptido con la característica de xilosa isomerasa, cuando se inserta en la célula eucariótica, proporciona la expresión de una enzima que favorece la isomerización de la xilosa a xilulosa.

30 El microorganismo descrito en la presente invención se modifica genéticamente mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido con función xilosa isomerasa. Los codones de esta secuencia de nucleótidos, originalmente descrita en *Orpinomyces* sp. (*XI* EC 5.3.1.5), fueron optimizados manualmente por los autores de la presente invención preferiblemente para su utilización por *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, la secuencia optimizada de xilosa isomerasa utilizada en la presente invención no es natural y es diferente de las secuencias naturales de xilosa isomerasa ya descritas en bancos públicos y está representada en **SEQ ID NO: 1**.

35 Después de la optimización de la secuencia representada en **SEQ ID NO: 1**, el CAI (Índice de Adaptación de Codones), índice que determina la posibilidad de altos niveles de expresión de proteínas, fue de 0,79 a 0,91, lo que

indica la obtención de una expresión eficaz de esta proteína en *S. cerevisiae*. El índice CAI es la media geométrica de los valores relativos de adaptación, y para su cálculo, se excluyen los codones no sinónimos y, en algunos casos, también los de terminación. Los valores varían entre 0 y 1, y los más grandes indican una mayor proporción de los codones más abundantes [Nucleic Acids Research 15:1281-1295].

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos representada en **SEQ ID NO: 1**, que codifica el péptido de tipo de xilosa isomerasa y que, opcionalmente, se puede insertar en la célula eucariótica para la expresión de dicha isomerasa en su forma activa. En el presente documento, los genes se insertan en microorganismos a través de la recombinación homóloga, comenzando así a integrar su genoma. El casete de expresión de la invención se caracteriza porque comprende: - una secuencia (**SEQ ID NO: 1**) de nucleótidos que codifican un péptido con función xilosa isomerasa; - al menos un promotor para dicha secuencia de nucleótidos codificante; y - una secuencia de nucleótidos seleccionada entre: una secuencia de nucleótidos terminadora de la transcripción; un marcador de selección; una o más secuencias de nucleótidos codificantes de otras enzimas; combinaciones de los mismos o un plásmido que comprende tales secuencias, siendo heteróloga al menos una de las secuencias de nucleótidos definidas anteriormente. Se pueden utilizar uno o más casetes de expresión en la transformación de células eucarióticas de acuerdo con la invención.

Opcionalmente, el casete de expresión de la invención también comprende secuencias seleccionadas del grupo que comprende las secuencias codificantes de las enzimas Xiluloquinasa (**SEQ ID NO: 9**), Transaldolasa (**SEQ NO ID: 5**), Transcetolasa (**SEQ ID NO: 11**), Ribosa 5-fosfato isomerasa (**SEQ ID NO: 7**) y/o Ribosa 5-fosfato epimerasa (**SEQ ID NO: 12**).

En una realización, la célula anfitriona eucariótica/de microorganismo es levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que cualquier célula eucariótica puede transformarse con uno o más casetes de expresión de la invención, que comprende la secuencia de nucleótidos descrita en **SEQ ID NO: 1**.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula eucariótica, levaduras u hongos filamentosos, preferiblemente levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, transformados con la secuencia de nucleótidos descrita en **SEQ ID NO: 1**, que se puede presentar en una sola copia o, preferiblemente, se pueden insertar múltiples copias de esta secuencia de nucleótidos en el genoma.

En una realización, la célula anfitriona modificada genéticamente comprende adicionalmente genes de la ruta de la pentosa fosfato, de modo que la inserción de **SEQ ID NO: 1**, que codifica la xilosa isomerasa, favorece la isomerización de xilosa a xilulosa. Sin embargo, además de la inserción de **SEQ ID NO: 1** en la célula anfitriona, la presente invención describe modificaciones genéticas en la misma célula con el objetivo de favorecer el flujo metabólico a través de las rutas de la pentosa fosfato, sin ser tales modificaciones, sin embargo, un factor restrictivo para transformar la célula anfitriona con la secuencia de nucleótidos representada en **SEQ ID NO: 1**.

Para aumentar el flujo de la ruta de la pentosa fosfato en la célula anfitriona, se insertan genes que codifican las enzimas Xiluloquinasa (*XKS1*, EC 2.7.1.17), cuya secuencia de nucleótidos está representada en este documento por **SEQ ID NO: 9**, Transaldolasa *TAL1* EC 2.2.1.2), representada por la secuencia **SEQ NO ID: 5**, Transcetolasa (*TKL1* EC 2.2.1.1), cuya secuencia de nucleótidos está representada por **SEQ ID NO: 11**, Ribosa 5-fosfato isomerasa (*RKI1*, EC 5.3.1.6), cuya secuencia de nucleótidos está representada por **SEQ ID NO: 7**; y Ribosa 5-fosfato epimerasa (*RPE1*, EC 5.1.3.1), cuya secuencia de nucleótidos está representada por **SEQ ID NO: 12**.

Entre las enzimas presentadas, y que constituyen la ruta de la pentosa-fosfato, así como la xilosa isomerasa representada por **SEQ ID NO: 1**, al menos uno de los genes que las codifican debe presentarse expresado en exceso y, preferiblemente, vinculado a los promotores constitutivos, es decir, aquellos que se expresan constantemente, independientemente de las condiciones a las que se somete la célula, o promotores inducibles naturalmente. En el presente documento, los promotores se definen como una región reguladora, ubicada en la región 5' bajo su acción y responsable del inicio de la transcripción, mientras que los terminadores se definen como una secuencia que determina el final del gen durante el procedimiento de transcripción.

La expresión en exceso de los genes que codifican estas enzimas se puede deber al aumento en el número de copias de la secuencia de nucleótidos que las codifican, la expresión de genes episómicos presentes en el vector que se pueden insertar en la célula anfitriona eucariótica, mediante el uso de promotores heterólogos para esa secuencia en la que están operativamente unidos, o incluso homólogos para la célula donde se insertaron, o como endógenos en la célula anfitriona, siempre que puedan producir un estado estable de transcripción más alto que el que lograría la célula en su versión sin modificaciones genéticas presentes, en las situaciones en donde las fuentes de carbono como glucosa y xilosa están disponibles en el medio ambiente. Estos promotores pueden ser constitutivos o naturalmente inducibles.

En una realización, la presente invención proporciona una célula anfitriona que comprende un casete de expresión que contiene genes endógenos de enzimas de la fase no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato, que,

preferiblemente, se construyen utilizando promotores fuertes y constitutivos de la célula en la que se insertarán. Específicamente, la presente invención describe cuatro realizaciones de casetes de expresión integrativa, que se construyeron utilizando una elevada expresión y promotores constitutivos de *Saccharomyces cerevisiae*, y se integraron de manera estable en el genoma de la célula anfitriona.

5 Uno de los casetes descritos contiene el gen que codifica la xilosa isomerasa, **SEQ ID NO: 1**. En este casete, una copia de **SEQ ID NO: 1** se inserta en la célula anfitriona flanqueada, preferiblemente, por la región promotora y terminadora del gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (*TDH1*). Así, brevemente, el casete que contiene el gen que codifica la xilosa isomerasa y que se insertó en el genoma de la célula anfitriona está formado por el promotor TDH1, cuya secuencia de nucleótidos está representada por **SEQ ID NO: 2**, el gen XI (**SEQ ID NO: 1**) y el terminador TDH1, cuya secuencia de nucleótidos está representada por **SEQ ID NO: 3**.

15 Un segundo casete descrito en la presente invención contiene un gen que codifica la enzima Xiluloquinasa (**SEQ ID NO: 9**). La presente descripción indica que el casete se construye, preferiblemente, utilizando el promotor y el terminador génicos del gen que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa (*ADH1*). Por lo tanto, se describe que el casete que contiene el gen codificante de la Xiluloquinasa está construido por el promotor *ADH1*, representado por **SEQ ID NO: 8**, el gen *XKS1* (**SEQ ID NO: 9**) y el terminador *ADH1*, representado por **SEQ ID NO: 10**.

20 Un casete más de la presente invención contiene genes codificantes de Transaldolasa (**SEQ NO ID:5**) y Ribosa 5-fosfato isomerasa (**SEQ ID NO: 7**). Este casete está construido, preferiblemente utilizando promotores y terminadores de la enzima que codifica el gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (*TDH1*) para flanquear el gen de la Transaldolasa y los promotores y terminadores de la enzima 3-fosfoglicerato quinasa (*PGK1*) para flanquear el gen de la Ribosa 5-fosfato isomerasa. Así, brevemente, el casete de expresión está construido, preferiblemente, del promotor TDH1 (**SEQ ID NO: 2**), el gen *TAL1* (**SEQ ID NO: 5**) y el terminador TDH1 (**SEQ ID NO: 3**), seguido del promotor *PGK1*, cuya secuencia de nucleótidos está representada por **SEQ ID NO: 6**, el gen *RK11* (**SEQ ID NO: 7**) y el terminador, cuya secuencia de nucleótidos está representada por **SEQ ID NO: 13**.

30 El último casete de la presente invención contiene genes codificantes de Transcetolasa (**SEQ ID NO: 11**) y Ribosa 5-fosfato epimerasa (**SEQ ID NO: 12**), preferiblemente, con una función asociada a los promotores y terminadores de los genes Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (*TDH1*), flanqueando el gen de la Transcetolasa y el promotor y terminador del gen que codifica la enzima 3-Fosfoglicerato quinasa (*PGK1*). Por lo tanto, brevemente, el casete de expresión que se insertó en el genoma de la célula anfitriona y contiene los genes de la Transcetolasa y la Ribosa 5-fosfato epimerasa, está construido preferiblemente por el promotor TDH1 (**SEQ ID NO: 2**), el gen *TKL1* (**SEQ ID NO: 11**) y el terminador TDH1 (**SEQ ID NO: 3**), seguido del promotor *PGK1* (**SEQ ID NO: 6**), el gen *RPE1* (**SEQ ID NO: 12**) y el terminador *PGK1* (**SEQ ID NO: 13**).

40 Todos los casetes de expresión con los genes de la ruta metabólica de la pentosa fosfato que favorecen el consumo de xilosa se insertan en la región del cromosoma diana ubicado entre el centrómero y el primer gen adyacente al mismo, preferiblemente en la región de los 5 mil primeros pares de bases contados a partir de el centrómero tanto en dirección *aguas arriba* como *aguas abajo*, e incluso puede ser inmediatamente *aguas arriba*, inmediatamente *aguas abajo* o ambas a la vez.

45 Se considera que la dirección *aguas arriba* es aquella se encuentra previamente al punto de inicio de la unidad de transcripción de una secuencia de ADN, que comienza en el promotor y termina en el terminador. A su vez, se considera que la región *aguas abajo* se ubica después del punto de inicio de la unidad de transcripción de una secuencia de ADN.

50 Además de la inserción de casetes de expresión, la presente invención también se refiere a la delección o inactivación del gen *GRE3*, que codifica la aldosa reductasa y está representado en **SEQ ID NO: 14**. La producción de xilitol reduce el rendimiento total de etanol que se puede obtener. Además, el xilitol es un inhibidor de la acción de la enzima xilosa isomerasa.

55 Cuando se realizan en *Saccharomyces cerevisiae*, las modificaciones genéticas mencionadas favorecen el flujo de la parte no oxidativa de la ruta de la pentosa-fosfato.

Después, el Ejemplo 4 muestra que la simple inserción del gen que favorece el flujo metabólico por la ruta de la pentosa fosfato, así como el péptido que codifica el gen de tipo xilosa isomerasa en la célula anfitriona, no garantizan el consumo eficaz de las pentosas presentes en el medio.

60 Por lo tanto, la presente invención proporciona la integración estable y un elevado número de copias de casetes que expresan XI (**SEC ID N: 1**) en el genoma de la célula anfitriona. En el presente documento, se considera un elevado número de copias la inserción de, al menos, 5 copias del gen en cuestión, siendo preferida la inserción de al menos 20 copias.

El presente documento describe, sin embargo, una célula eucariótica, preferiblemente un microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, genéticamente modificada que contiene en su genoma al menos uno de los genes de enzimas necesarios para favorecer la parte no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato, insertados preferiblemente en un elevado número de copias y en la región entre el centrómero y su primer gen adyacente. Al tener toda la ruta metabólica necesaria para convertir la xilosa, en condiciones aerobias, la línea puede consumir la xilosa presente en el medio de cultivo, pero en condiciones anaerobias, el consumo es muy lento.

Se describe adicionalmente un procedimiento de evolución dirigida a partir del cual se obtiene un microorganismo con mayor capacidad de consumo de xilosa en condiciones anaerobias y, a partir de ese momento, una mayor tasa de crecimiento y una mayor producción de compuestos bioquímicos y biocombustibles por período de tiempo, en comparación con el microorganismo que no fue sometido a dicho procedimiento. En dicho procedimiento, un microorganismo de la especie *Saccharomyces cerevisiae* fue sometido a presiones evolutivas que consistieron en aumentos progresivos de la concentración de xilosa como la única fuente de carbono, con el fin de seleccionar microorganismos con mutaciones aleatorias que favorecieran un mayor consumo de xilosa en condiciones anaerobias y, en consecuencia, una mayor tasa de crecimiento y una mayor producción de compuestos bioquímicos y biocombustibles, preferiblemente etanol. El Ejemplo 4 muestra resultados comparativos entre el microorganismo resultante de este procedimiento y el microorganismo antes del procedimiento de evolución dirigida. El microorganismo modificado genéticamente descrito en la presente invención presenta de manera diferencial las características de ser no floculante, presentar un alto rendimiento de etanol, una baja formación de glicerol y xilitol, una alta viabilidad, una alta tasa de crecimiento, no producir espuma, además de una capacidad eficaz de resistencia al estresante procedimiento de fermentación industrial. Este microorganismo está archivado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivo Celular - Leibniz-Institut DSMZ, con el número DSM28739.

El microorganismo DSM28739 de la presente invención muestra características de interés industrial tales como: ser una cepa no floculante, presentar un alto rendimiento de etanol, una baja formación de glicerol y xilitol, una alta viabilidad, una alta tasa de crecimiento, no producir espuma, entre otras.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de biocombustibles y compuestos bioquímicos a partir de biomasa vegetal, preferiblemente una porción lignocelulósica de la biomasa vegetal. El procedimiento descrito en la presente invención utiliza el microorganismo de la invención para producir biocombustibles y/o compuestos bioquímicos.

En una realización, el procedimiento consiste en las siguientes etapas:

- poner el microorganismo DSM28739 en contacto con material lignocelulósico; y
- opcionalmente, realizar la recolección posterior del compuesto generado.

En otra realización, dicho material lignocelulósico se obtiene por medio de tratamiento previo de biomasa vegetal lignocelulósica, seguido de hidrólisis.

El procedimiento de la invención proporciona la producción de biocombustibles que comprenden predominantemente alcoholes, especialmente etanol. El procedimiento de la invención proporciona la producción de compuestos bioquímicos seleccionados del grupo que comprende, pero no se limita a: ácido succínico, ácido málico, 1,3-propanodiol, 1,2-propanodiol, butanol, isobutanol, biodiesel, 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol y/o PHB - poli(hidroxitbutirato).

Adicionalmente se describen biocombustibles, preferiblemente etanol, y compuestos bioquímicos producidos por el procedimiento que utiliza el microorganismo de la invención, tal como DSM28739.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Construcción de casetes para la expresión e inserción de los mismos en el genoma

Para construir cada uno de los casetes que contienen genes de la fase no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, incluyendo el gen de la Xilosa isomerasa, cada uno de los genes se amplificó por PCR del genoma de *S. cerevisiae* y se clonó en casetes de expresión integrativa.

Adyacente al terminador de cada casete, el gen *URA3* flanqueado fue clonado por dos regiones *loxP* en la misma orientación, permitiendo que esta región sea eliminada por la expresión de la recombinasa Cre y el marcador auxótrofo *URA3* para ser utilizado en todos los casetes de expresión con los genes descritos.

Con respecto a la construcción del casete de expresión que contiene el gen que codifica la xilosa isomerasa, además de la construcción mencionada anteriormente, en los extremos del casete, se clonaron 126 pb de cada lado con homología a una región cercana al cromosoma cinco de *Saccharomyces cerevisiae*, permitiendo la integración

mediante recombinación homóloga en esta región.

Para la construcción del casete de expresión con el gen que codifica la xiluloquinasa, por ejemplo, este gen se amplificó por PCR del genoma de *S. cerevisiae* y se clonó adyacente al promotor y terminador del gen que codifica la Alcohol deshidrogenasa (*ADH1*). Después del terminador, se insertó el gen *URA3* flanqueante por medio de dos regiones *loxP* en la misma orientación. En los extremos del casete, se clonaron las regiones de homología cercanas al centrómero dos y ocho de *S. cerevisiae*. Se llevaron a cabo dos transformaciones para insertar los casetes que expresaban el gen *XKS1* a 288 pb del centrómero dos y 228 pb del centrómero ocho. De esta manera, además de la copia endógena, el transformante tiene dos copias más del gen *XKS1* bajo la acción de un promotor constitutivo de elevada expresión.

En relación con el casete de expresión que contiene genes codificantes de Transaldolasa (*TAL1*) y Ribosa 5-fosfato isomerasa (*RK11*), por ejemplo, estos genes se clonaron bajo la acción de promotores y terminadores de los genes Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (*TDH1*) y 3-Fosfoglicerato quinasa (*PGK1*), respectivamente, separados por el *URA3* marcador flanqueado por los sitios *loxP*, y se insertaron adecuadamente en el cromosoma de la célula anfitriona.

En relación con el casete de expresión que contiene genes codificantes de Transcetolasa (*TKL1*) y Ribosa 5-fosfato epimerasa (*RPE1*), por ejemplo, estos genes se clonaron bajo la acción de promotores y terminadores de los genes Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (*TDH1*) y 3-Fosfoglicerato quinasa (*PGK1*), respectivamente, separados por el marcador *URA3* flanqueado por los sitios *loxP*, y se insertaron adecuadamente en el cromosoma de la célula anfitriona.

La transformación de la célula anfitriona con cada uno de los casetes que contienen genes de la fase no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato siguió el protocolo de Gietz y Schiestl [Nature Protocols 2, 31 - 34; 2007], por medio de acetato de litio, y cada uno de los genes, flanqueado por promotores y terminadores fuertes y constitutivos de *Saccharomyces cerevisiae*, se integró de forma estable en el cromosoma de la célula anfitriona. La integración correcta fue confirmada por PCR. Después de la confirmación, la región *URA3* fue escindida del genoma por expresión transitoria de la recombinasa *Cre*, dejando solo un sitio *loxP* en el lugar, después del terminador del gen insertado.

En los extremos del casete de la Xilosa isomerasa, se clonaron 126 pb de cada lado con homología con una región próxima al cromosoma cinco de *Saccharomyces cerevisiae*, permitiendo la integración mediante recombinación homóloga en esta región.

Ejemplo 2 - Inserción del casete de Xilosa isomerasa en el genoma en un elevado número de copias

Para garantizar la integración estable y el elevado número de copias en la célula anfitriona, el casete que expresa la Xilosa Isomerasa representada por **SEQ ID NO: 1** se modificó con la inclusión, en los extremos del casete, de elementos delta de retrotransposón *Ty1* (elemento presente en un gran número de copias en el genoma de *S. cerevisiae*).

El marcador *URA3* flanqueado por las regiones *loxP* se reemplaza en este plásmido por el marcador *LEU2*. Anteriormente, el gen *LEU2* se elimina en una etapa de manipulación genética. En esta etapa, se integra el gen *URA3*, flanqueado por las regiones *loxP* adyacentes a las regiones de homología del promotor y terminador de *LEU2*, lo que da como resultado la eliminación de este gen. A continuación se inserta el casete *XI*, flanqueado por los elementos *Ty1* y se utiliza el marcador auxótrofo *LEU2* para seleccionar transformantes.

Ejemplo 3 - Delección del gen GRE3

La delección del gen GRE3, que codifica la aldosa reductasa y está representada en **SEQ ID NO: 14**, se realizó en dos etapas a través de la manipulación genética, con el objetivo de reducir la producción de xilitol a partir de xilosa. En la primer etapa, se integró el gen *URA3*, flanqueado por las regiones *loxP* adyacentes a las regiones de homología del promotor y terminador del gen *GRE3*, lo que dio como resultado la delección de esta región. En la segunda etapa, después de confirmar la delección, se eliminó el marcador *URA3* por la expresión transitoria de la recombinasa *Cre*.

Ejemplo 4 - Evolución adaptativa y consumo de xilosa

Después de ser manipulado genéticamente con la inserción de todos los genes de la ruta metabólica necesaria para convertir la xilosa y antes de ser sometido a una evolución adaptativa, el microorganismo modificado genéticamente, en condiciones anaerobias, consumió la xilosa presente en el medio de cultivo lentamente y con baja generación de biocombustible, en este caso etanol, como se puede ver en la **Figura 1**.

Dicho microorganismo se sometió a un procedimiento de ingeniería evolutiva que consistió en repeticiones sucesivas en un medio que contenía 50 g/L de xilosa en condiciones semi-anaerobias. El inóculo se inició con una densidad óptica (DO) de ~1,0. Debido a un bajo crecimiento inicial, se añadió una baja cantidad de glucosa al medio en los primeros experimentos (0,5%) con el objetivo de que el cultivo creciera más rápido. Después de 48 horas de cultivo, se transfirió una alícuota a un nuevo matraz con medio de cultivo y se repitió el experimento. En la tercera transferencia, no fue necesaria la adición de glucosa al medio de cultivo debido a la mayor velocidad de crecimiento del microorganismo en la xilosa como única fuente de carbono. Se aislaron y analizaron 20 colonias de la mezcla de células evolucionadas. El microorganismo DSM28739 fue seleccionado por su rendimiento superior en términos de capacidad de conversión de xilosa a etanol, como se puede ver en la Figura 2.

Ejemplo 5 - Crecimiento del microorganismo DSM28739 utilizando xilosa como fuente de carbono

Preparación del inóculo

Una parte alícuota de cultivo del microorganismo DSM28739 previamente criopreservado a -85°C (en solución de glicerol al 20% p/v) se reactivó en medio YEPD (20 g/L de glucosa, 10 g de extracto de levadura y 20 g/L de peptona), durante 6 horas en un matraz Erlenmeyer de 100 mL que contenía 50 mL de medio YEPD, 20 g/L de glucosa en un agitador orbital a 200 rpm y 30°C. Posteriormente, una parte alícuota de este cultivo se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 200 mL de medio YEPD, 40 g/L de glucosa.

El cultivo se inició con una densidad óptica (DO) igual a 0,1, cuando se obtuvo a 600 nm de longitud de onda y se incubó a 200 rpm y 30°C durante 16 horas. Un volumen de este cultivo se transfirió a un tubo de fondo cónico de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Las células del sedimento se lavaron 3 veces en agua destilada por centrifugación y se resuspendieron en el medio de cultivo apropiado para la transferencia en el biorreactor (descrito a continuación).

Cultivo en biorreactor

Se prepararon 600 mL de medio de cultivo sintético en una botella de 1 L que comprendía xilosa como una de las fuentes de carbono, como el medio YEPX (20 g/L de xilosa, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona bacteriológica). El biorreactor con un volumen de trabajo de 1L se preparó con 500 mL de este medio de cultivo.

El biorreactor se esterilizó a continuación en autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 20 minutos. Los 100 mL restantes se transfirieron a una botella de 250 mL y también se esterilizaron en autoclave. La fuente de carbono se disolvió en 100 mL de agua destilada y esterilizada en autoclave en una botella de 250 mL. Después de la esterilización en autoclave, los 100 mL que contenían la fuente de carbono se transfirieron a un biorreactor.

El inóculo se preparó a partir de células obtenidas por centrifugación del inóculo previamente preparado con el cultivo del microorganismo DSM28739. Las células se resuspendieron en 100 mL del medio sin fuente de carbono y se inocularon inmediatamente en el biorreactor. El cultivo se inició con una DO = 3.

Durante el crecimiento celular, el pH se mantuvo en un intervalo de pH entre 3 y 7, mediante la adición de ácidos y/o bases. La temperatura y la velocidad de agitación también se mantuvieron constantes a 30°C y 200 rpm, respectivamente.

Para garantizar el estado de anaerobiosis, antes de la inoculación, el medio de cultivo y la atmósfera del biorreactor con un flujo de gas nitrógeno de 2 LN/min (litro normal por minuto) durante 10 minutos. Se recogieron dos muestras de 1,5 mL, aproximadamente cada tres horas. Una muestra se utilizó para medir la DO, mientras que la otra se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuantificación de productos de fermentación.

La cuantificación de xilosa, etanol y glicerol se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC y utilizando un cromatógrafo Alliance HT (Waters) con detector de índice de refracción (Waters 2414). Las rondas se realizaron utilizando una columna HPX-87H (BioRad) mantenida a 35°C, con ácido sulfúrico 4 mM como fase móvil y un flujo de 0,6 mL/min.

Observando la Figura 3, es posible verificar que el microorganismo DSM28739 consumió 20 g/L de xilosa en aproximadamente 18 horas. El principal producto de fermentación fue el etanol que alcanzó aproximadamente 9 g/L. También se observó glicerol, pero a baja concentración. La producción de glicerol se observa a baja concentración. La Tabla 2 muestra el rendimiento de etanol y la productividad volumétrica del microorganismo DSM28739.

Tabla 2: Rendimiento y productividad volumétrica del microorganismo DSM28739 en medio sintético que comprende xilosa como una de las fuentes de carbono, tal como el medio YEPX (20 g/L de xilosa, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona bacteriológica).

Línea	Rendimiento g/g (gramos de etanol producidos por gramo de xilosa consumida)	Productividad volumétrica de etanol de g/Lh (gramos de etanol producido por litro y por hora)
DSM28739	0,46 ± 0,01	0,69± 0,02

5 Ejemplo 6 - Fermentación del microorganismo DSM28739 utilizando producto hidrolizado de paja de caña

Medio de cultivo

10 El medio de cultivo se preparó utilizando producto hidrolizado de caña de paja que contenía entre 20 y 60 g/L de xilosa y/o de 20 a 60 g/L de glucosa. El producto hidrolizado se complementó con urea, para apoyar el crecimiento de la levadura.

Preparación del inóculo

15 Se reactivó una alícuota de cultivo del microorganismo DSM28739 previamente criopreservado a -85°C (en solución de glicerol al 20% p/v) durante 6 horas en un matraz Erlenmeyer de 100 mL que contenía 50 mL de medio YEPD 20 g/L de glucosa en un agitador orbital a 200 rpm y 30°C. Posteriormente, la parte alícuota de este cultivo se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 200 mL de medio YEPD 40 g/L de glucosa. El cultivo se inició con una DO = 0,1 (densidad óptica a 600 nm de longitud de onda), se incubó a 200 rpm y 30°C durante 16 horas. Un
20 volumen de este cultivo se transfirió a un tubo de fondo cónico de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Las células del sedimento se lavaron 3 veces en agua destilada por centrifugación y se resuspendieron en el medio de cultivo (hidrolizado).

Cultivo en biorreactor

25 Se esterilizaron 700 mL de producto hidrolizado de paja de caña en autoclave en una botella de 1 L. En el biorreactor con un volumen de trabajo de 1 L (previamente esterilizado en autoclave), se transfirieron 600 mL de producto hidrolizado y los 100 mL restantes se transfirieron a una botella de 250 mL (anteriormente esterilizada en autoclave) para la resuspensión posterior del inóculo. El inóculo se preparó a partir de células obtenidas por
30 centrifugación en el artículo anterior. Las células para el inóculo se resuspendieron en los 100 mL del producto hidrolizado y se inocularon inmediatamente en el biorreactor. El cultivo se inició con una DO = 1. Durante el crecimiento celular, el pH se mantuvo entre 3 y 7 mediante la adición automática de solución acuosa de ácidos o bases, como, por ejemplo, KOH 3 moles/L o H₂SO₄ 1 mol/L. La temperatura y la velocidad de agitación se mantuvieron constantes a 30°C y 200 rpm, respectivamente. Para garantizar el estado anaerobio, antes de la
35 inoculación, el medio de cultivo y la atmósfera del biorreactor se saturaron con un flujo de gas nitrógeno de 2 LN/min (litro normal por minuto) durante 10 minutos. Las muestras se recogieron a intervalos adecuados, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron congeladas a -20°C para su posterior análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

40 Cuantificación de productos de fermentación

La cuantificación de xilosa, etanol y glicerol se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC y utilizando el cromatógrafo Alliance HT (Waters) con detector de índice de refracción (Waters 2414). Las rondas se
45 realizaron utilizando una columna HPX-87H (BioRad) mantenida a 35°C, con ácido sulfúrico 4 mM como fase móvil y un flujo de 0,6 mL/min. La cinética de fermentación del microorganismo DSM28739 en el producto hidrolizado de caña de paja se puede observar en la Figura 4.

El microorganismo DSM28739 consumió glucosa muy rápido, en aproximadamente 30 horas. Después de 70 horas, la mayor parte de la xilosa también se consumió. El principal producto de fermentación fue el etanol, alcanzando
50 aproximadamente 37 g/L. También se observa una producción de glicerol a baja concentración. El principal inhibidor en el producto hidrolizado, el ácido acético, se mantuvo constante durante toda la fermentación (alrededor de 5 g/L).

La Tabla 3 muestra el rendimiento de etanol y la productividad volumétrica de DSM28739 en producto hidrolizado de caña de paja.

55

Tabla 3: Rendimiento y productividad volumétrica del microorganismo DSM28739 en producto hidrolizado de paja de caña

Línea	Rendimiento g/g (gramos de etanol producidos por gramo de azúcares consumidos)	Productividad volumétrica de etanol g/Lh (gramos de etanol producido por litro y por hora)
DSM28739	0,44 ± 0,009	0,64 0,005

Ejemplo 7 - Prueba de inserción de casetes en el microorganismo modificado genéticamente DSM28739

- 5 El ADN de la línea DSM28739 se utilizó como modelo para la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos que se encuentran en una región externa a la inserción de casetes de expresión génica. Para cada reacción, se utilizó un par de oligos específicos para la región externa de cada casete insertado.
- 10 Después del experimento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se aplicó una alícuota al gel de agarosa al 0,8%, se tiñó con GelRed y se sometió a electroforesis para separar los fragmentos amplificados.
- 15 La Figura 6 muestra el gel de electroforesis obtenido a partir de reacciones externas a los casetes insertados, lo que demuestra la integración en las levaduras. En esta figura, M representa la escala del marcador de 1 kb; 1a, es el casete del gen XKS1 insertado junto al centrómero 2; 1b, el blanco de la reacción 1; 2a es el casete del gen XKS1 insertado al lado del centrómero 8; 2b es el blanco de la reacción 2; 3a es el casete de genes TAL1 y RKI1 insertado al lado del centrómero 12; 3b es el blanco de la reacción 3; 4a es el casete de genes TKL1 y RPE1 insertados junto al centrómero 13; 4b es el blanco de la reacción 4; 5a es el casete del gen XI insertado junto al centrómero 5; y 5b es el blanco de la reacción 5.
- 20 Por lo tanto, es posible observar en la Figura 6 que los casetes se insertaron correctamente en la ubicación prevista. Este resultado se observa debido a la amplificación de bandas con un tamaño similar al casete construido.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> BioCelere Agroindustrial Ltda.
- 5 <120> Casete de expresión para la transformación de células eucarióticas, procedimiento para transformar células eucarióticas, microorganismo modificado genéticamente, procedimiento para la producción de biocombustibles y/o compuestos bioquímicos y biocombustibles y compuestos bioquímicos producidos de ese modo
- <130> EP109432FZ268pau
- 10 <140> 15806997.1
<141> 12-06-2015
- <150> PCT/BR2015/050075
<151> 12-06-2015
- 15 <150> BR102014014407-2
<151> 12-06-2014
- <160> 17
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 1314
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Secuencia codificante de péptido con característica de xilosa isomerasa
- 30 <400> 1
atgactaaag aatattttcc aactattggt aaaattagat ttgaaggtaa agattctaag 60
aatccaatgg ccttcatta ctatgatgct gaaaagaag tcatgggtaa gaaaatgaaa 120
gattggtaa gatttgccat ggcctggtgg catactttgt gcgccgatgg tgctgaccaa 180
ttcgggtgtg gtactaagtc ttttccatgg aatgaaggta ctgaccaat tgctattgcc 240
aaacaaaagg ttgatgctgg ttttgaaatt atgaccaaat tgggtattga acattattgt 300
ttccacgatg ttgatttagt ttctgaagggt aattctattg aagaatatga atctaacttg 360
aaacaagttg ttgcttactt gaaacaaaag caacaagaaa ctggtattaa attattgtgg 420
tctactgcca atgttttttg taatccaaga tatatgaacg gtgcctctac taatccagac 480
tttgatgtcg tcgccagagc tattgttcaa attaagaacg ccatggacgc cggatttgaa 540
ttgggtgctg aaaactacgt cttctggggt ggtagagaag gttatatgtc attgttaaac 600
actgaccaa aaagagaaaa ggaacatag gctactatgt tgactatggc tagagattac 660
gctagatcta aaggttttta gggacttttc ttaattgaac caaaaccaat ggaaccaacc 720
aagcatcaat atgacgttga tactgaaact gttattgggt tcttgagagc tcacaattta 780
gacaaagact ttaaggtcaa cattgaagtt aatcacgcta ctttagctgg tcatactttc 840
gaacacgaat tggcctgtgc tgttgatgct ggtatgtag gttctattga tgctaacaga 900

ES 2 773 639 T3

	ggtgactatc	aaaatggttg	ggacactgat	caattcccaa	ttgatcaata	tgaattggtc	960
	caagcttggg	tggaaattat	cagagtggtg	ggttttgtta	ctggtggtac	caacttcgat	1020
	gccaaaacta	gaaggaactc	taccgattta	gaagatatta	tcattgctca	tatttctggt	1080
	atggatgcca	tggctagagc	tttgaaaaat	gctgccaagt	tattgcaaga	atctccatat	1140
	tgtaatatga	aaaaggaaag	atacgcttct	tttgactctg	gtattggtaa	agactttgaa	1200
	gatggtaagt	taactttgga	acaagtttac	gaatatggta	aaaagaatgg	tgaacccaaa	1260
	gttacttctg	gtaagcaaga	attatatgaa	gctattggtg	ccatgtacca	ataa	1314
	<210> 2						
	<211> 742						
5	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
10	<223> Promotor de Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1 (TDH1)						
	<400> 2						
	aatgtatatg	ctcatttaca	ctccatatca	ccatatggag	gataagttgg	gttgagcttc	60
	tgatccaatt	tattctatcc	attagttgct	gatatgtccc	accagccaac	acttgatagt	120
	atctactogc	cattcacttc	cagcagcgcc	agtagggttg	ttgagcttag	taaaaatgtg	180
	cgcaccacaa	gcctacatgt	ctccacgtca	catgaaacca	caccgtgggg	ccttgttgcg	240
	ctaggaatag	gatatgcgac	gaagacgctt	ctgcttagta	accacaccac	attttcaggg	300
	ggtcgatctg	cttgcttctc	ttactgtcac	gagcggccca	taatcgcgct	ttttttttaa	360
	aagacgcgag	acagcaaaca	ggaagctcgg	gtttcaacct	tcggagtggt	cgcagatctg	420
	gagactggat	ctttacaata	cagtaaggca	agccaccatc	tgcttcttag	gtgcatgcga	480
	cggatccac	gtgcagaaca	acatagtctg	aagaaggggg	gaggagcatg	ttcattctct	540
	gtagcagtaa	gagcttgggt	ataatgacca	aaactggagt	ctcgaaatca	tataaataga	600
	caatatattt	tcacacaatg	agattttag	tacagttcta	ttctctctct	tgcataaata	660
	agaaattcat	caagaacttg	gtttgatatt	tcaccaacac	acacaaaaaa	cagtacttca	720
	ctaaatttac	acacaaaaca	aa				742
	<210> 3						
15	<211> 305						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
20	<223> Terminador de deshidrogenasa de 3-fosfato de gliceraldehído, isoenzima 1 (TDH1)						
	<400> 3						
	ataaagcaat	cttgatgagg	ataatgattt	ttttttgaat	atacataaat	actaccgttt	60

ES 2 773 639 T3

	ttctgctaga ttttgtaaag acgtaaataa gtacatatta ctttttaagc caagacaaga	120
	ttaagcatta actttaccct tttctcttct aagttttaac actagttatc actgttaaaa	180
	aattatggcg agaacgctcg cggttaaaat atattaccct gaatgtggtg aattgaagtt	240
	cttgatggt ttaaagattt ttcctttttg ggaaataagt aaacaatata ttgctgcctt	300
	tgcaa	305
	<210> 4	
	<211> 1349	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia codificante de los genes URA3 y loxp	
10	<400> 4	
	cactataggg cgaattgggc cgcacgtcgc atgctcccgg ccgccaatggc ggccgcggga	60
	attcgatata acttctgata gcatacatta tacgaagtta tggccataa agcttttcaa	120
	ttcatctttt ttttttttgt tctttttttt gattccgggt tctttgaaat ttttttgatt	180
	cggtaatctc cgagcagaag gaagaacgaa ggaaggagca cagacttaga ttggtatata	240
	tacgcatatg tgggtttgaa gaaacatgaa attgcccagt attcttaacc caactgcaca	300
	gaacaaaaac ctgcaggaaa cgaagataaa tcatgtcgaa agctacatat aaggaacgtg	360
	ctgctactca tcctagtcct gttgctgcca agctatthaa tatcatgcac gaaaagcaaa	420
	caaacttggtg tgcttcattg gatgttcgta ccaccaagga attactggag ttagttgaa	480
	cattaggtcc caaaatttgt ttactaaaaa cacatgtgga tatcttgact gatttttcca	540
	tggagggcac agttaagccg ctaaaggcat tatccgcaa gtacaatttt ttactcttcg	600
	aagacagaaa atttgctgac attggtaata cagtcaaatt gcagtactct gcgggtgtat	660
	acagaatagc agaatgggca gacattacga atgcacacgg tgtggtgggc ccaggtattg	720
	ttagcggttt gaagcaggcg gcggaagaag taacaaagga acctagaggc cttttgatgt	780
	tagcagaatt gtcacgcaag ggctccctag ctactggaga atataactaag ggtactgttg	840
	acattgcgaa gagcgacaaa gattttgtta tcggctttat tgctcaaaga gacatgggtg	900
	gaagagatga aggttacgat tggttgatta tgacaccggt tgtgggttta gatgacaagg	960
	gagacgcatt gggtaacag tatagaaccg tggatgatgt ggtctctaca ggatctgaca	1020
	ttattattgt tggagagga ctatttgcaa agggaaggga tgctaaggtg gaggtgaa	1080
	gttacagaaa agcaggctgg gaagcatatt tgagaagatg cgccagcaa aactaaaaa	1140
	ctgtattata agtaaagca tgtatactaa actcaciaaat tagagcttca atttaattat	1200
	atcagttatt acccggaat ctcggtcgtg atgatttcta taacttcgta tagcatacat	1260
	tatacgaagt tatatcacta gtgaattcgc ggccgcctgc aggtcgacca tatgggagag	1320
	ctcccaacgc gttggatgca tagcttgag	1349
15	<210> 5	
	<211> 1008	
	<212> ADN	

ES 2 773 639 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Transaldolasa (TAL1)

5

<400> 5

atgtctgaac cagctcaaaa gaaacaaaag gttgctaaca actctctaga acaattgaaa	60
gcctccggca ctgtcgttgt tgccgacact ggtgatttcg gctctattgc caagtttcaa	120
cctcaagact ccacaactaa cccatcattg atcttggtg ctgccaagca accaacttac	180
gccaagttga tcatggttgc cgtggaatac ggtaagaagc atggtaagac caccgaagag	240
caagtcgaaa atgctgtgga cagattgtta gtcgaattcg gtaaggagat cttaaagatt	300
gttccaggca gagtctccac cgaagttgat gctagattgt cttttgacac tcaagctacc	360
attgaaaagg ctagacatat cattaatgt tttgaacaag aaggtgtctc caagaaaga	420
gtccttatta aaattgcttc cacttgggaa ggtattcaag ctgccaaga attggaagaa	480
aaggacggta tccactgtaa tttgactcta ttattctcct tcggtcaagc agttgcctgt	540
gccgaggccc aagttacttt gatttcccca tttgttggtg gaattctaga ctggtacaaa	600
tccagcactg gtaaagatta caagggtgaa gccgaccag gtgttatttc cgtcaagaaa	660
atctacaact actacaagaa gtacggttac aagactattg ttatgggtgc ttctttcaga	720
agcactgacg aaatcaaaaa cttggctggt gttgactatc taacaatttc tccagcttta	780
ttggacaagt tgatgaacag tactgaacct ttccaagag ttttgaccc tgtctccgct	840
aagaaggaag ccggcgacaa gatttcttac atcagcgacg aatctaaatt cagattcgac	900
ttgaatgaag acgctatggc cactgaaaaa ttgtccgaag gtatcagaaa attctctgcc	960
gatattgtta ctctattcga cttgattgaa aagaaagtta ccgcttaa	1008

<210> 6

10 <211> 873

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Promotor de 3-Fosfato quinasa (PGK1)

<400> 6

tactgtaatt gcttttagtt gtgtatTTTT agtgtgcaag tttctgtaaa tcgattaatt	60
tttttttctt tcctcttttt attaacctta atttttattt tagattcctg acttcaactc	120
aagacgcaca gatattataa catctgcata ataggcattt gcaagaatta ctctgagta	180

ES 2 773 639 T3

aggaaagagt gaggaactat cgcatacctg catttaaaga tgccgatttg ggcgcgaatc 240
ctttatTTTTg gcttcaccct catactatta tcagggccag aaaaaggaag tgttccctc 300
cttcttgaat tgatgttacc ctcataaagc acgtggcctc ttatcgagaa agaaattacc 360
gtcgcctcgtg atttgtttgc aaaaagaaca aaactgaaaa aaccagaca cgctcgactt 420
cctgtcttcc tattgattgc agcttccaat ttcgtcacac aacaagggtcc tagcgacggc 480
tcacaggttt tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca 540
catgctatga tgcccactgt gatctccaga gcaaagtctg ttcgatcgtc ctgttactct 600
ctctctttca aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc 660
ttttcttcta accaaggggg tggtttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca 720
tatatataaa ctgcataaa ttgggtcaatg caagaaatac atatttggtc ttttctaatt 780
cttagttttt caagttctta gatgctttct ttttctcttt tttacagatc atcaaggaag 840
taattatcta ctttttaca caaatataaa aca 873

<210> 7
<211> 777
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Ribosa 5-fosfato isomerasa (RKI1)

<400> 7
atggctgccg gtgtccaaa aattgatgcg ttagaatctt tgggtaatcc tttggaggat 60
gccaagagag ctgcagcata cagagcagtt gatgaaaatt taaaatttga tgatcacaaa 120
ataattggaa ttggtagtgg tagcacagtg gtttatgttg ccgaaagaat tggacaatat 180
ttgcatgacc ctaaatttta tgaagtagcg tctaaattca tttgcattcc aacaggattc 240
caatcaagaa acttgatttt ggataacaag ttgcaattag gctccattga acagtatcct 300
cgcattgata tagcgtttga cggtgctgat gaagtggatg agaatttaca attgattaaa 360
gggtgtggtg cttgtctatt tcaagaaaa ttggttagta ctagtgctaa aaccttcatt 420
gtcgttgctg attcaagaaa aaagtcacca aacatttag gtaagaactg gaggcaagg 480
gttcccattg aaattgtacc ttcctcatac gtgagggtca agaattgatc attagaacaa 540
ttgcatgctg aaaaagttga catcagacaa ggaggttctg ctaaagcagc tcctgttgta 600
actgacaata ataacttcat tatcgatgcg gatttcgggtg aaatttccga tccaagaaaa 660
ttgcatagag aaatcaaact gttagtgggc gtggtggaaa caggtttatt catcgacaac 720
gcttcaaaag cctacttcgg taattctgac ggtagtgttg aagttacgga aaagtga 777

<210> 8
15 <211> 702
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Promotor de la enzima Alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1)

<400> 8

ES 2 773 639 T3

ttccgggtgt acaatatgga cttcctcttt tctggcaacc aaaccatac atcgggatcc 60
ctataatacc ttcggttggtc tccctaacat gtaggtggcg gaggggagat atacaataga 120
acagatacca gacaagacat aatgggctaa acaagactac accatttaca ctgcctcatt 180
gatggtggta cataacgaac taatactgta gccctagact tgatagccat catcataatcg 240
aagtttcaact accctttttc catttgccat ctattgaagt aataataggc gcatgcaact 300
tcttttcttt tttttttttt ctctctcccc cgttggtgtc tcaccatatac cgcaatgaca 360
aaaaaatgat ggaagacact aaaggaaaaa attaacgaca aagacagcac caacagatgt 420
cgttggtcca gagctgatga ggggtatctc gaagcacacg aaactttttc cttccttcat 480
tcacgacac tactctctaa tgagcaacga tatacggcct tccttccagt tacttgaatt 540
tgaaataaaa aaagtttgct gtcttgctat caagtataaa tagacctgca attattaatc 600
ttttgtgttc tcgtcattgt tctcgttccc tttcttctt gtttcttttt ctgcacaata 660
tttcaagcta taccaagcat acaatcaact atctcatata ca 702

<210> 9
<211> 1803
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Xiluloquinasa (XKS1)

<400> 9
atggtgtggt cagtaattca gagacagaca agagaggttt ccaacacaat gtctttagac 60
tcatactatc ttgggtttga tctttcgacc caacaactga aatgtctcgc cattaaccag 120
gacctaaaaa ttgtccattc agaaacagtg gaatttgaaa aggatcttcc gcattataac 180
acaaagaagg gtgtctatat acacggcgac actatcgaat gtcccgtagc catgtggtta 240
gaggctctag atctggttct ctcgaaatat cgcgaggcta aatttccatt gaacaaagtt 300
atggccgtct cagggctctg ccagcagcac gggctctgtct actggctctc ccaagccgaa 360
tctctgtag agcaattgaa taagaaaccg gaaaaagatt tattgacta cgtgagctct 420
gtagcatttg caaggcaaac cgcccccaat tggcaagacc acagtactgc aaagcaatgt 480
caagagtttg aagagtgcac aggtgggcct gaaaaaatgg ctcaattaac agggccaga 540
gccatttta gatttactgg tctctaaatt ctgaaaattg cacaattaga accagaagct 600
tacgaaaaaa caagacat ttctttagtg tctaattttt tgacttctat cttagtgggc 660

ES 2 773 639 T3

catcttggtg aattagagga ggcagatgcc tgtggtatga acctttatga tatacgtgaa 720
 agaaaaattca gtgatgagct gctacatcta attgatagtt cttctaagga taaaactatc 780
 agacaaaaat taatgagagc acccatgaaa aatttgatag cgggtacat ctgtaaataat 840
 tttatgaga agtacggttt caatacaaac tgcaaggtct ctcccatgac tggggataat 900
 ttagccacta tatgttcttt acccctgcgg aagaatgacg ttctcgtttc octaggaaca 960
 agtactacag ttcttctggt caccgataag tatcaccocct ctccgaacta tcactctttc 1020
 attcatccaa ctctgccaaa ccattatatg ggtatgattt gttattgtaa tggttctttg 1080
 gcaagggaga ggataagaga cgagttaaac aaagaacggg aaaataatta tgagaagact 1140
 aacgattgga ctctttttaa tcaagctgtg ctagatgact cagaaagtag tgaaaatgaa 1200
 ttagtggtat attttctctt gggggagatc gttcctagcg taaaagccat aaacaaaagg 1260
 gttatcttca atccaaaaag gggatgatt gaaagagagg tggccaagt caaagacaag 1320
 aggcaogatg ccaaaaaatat tgtagaatca caggctttaa gttgcagggt aagaatatct 1380
 ccactgcttt cggattcaaa cgcaagctca caacagagac tgaacgaaga tacaatcgtg 1440
 aagtttgatt acgatgaatc tccgctgcgg gactacctaa ataaaaggcc agaaaggact 1500
 tttttttagt gtggggcttc taaaaacgat gctattgtga agaagtttgc tcaagtcatt 1560
 ggtgctacaa agggtaattt taggctagaa acaccaaact catgtgccct tggtggttgt 1620
 tataaggcca tgtggtcatt gttatacagc tctaataaaa ttgcagttcc ttttgataaa 1680
 tttctgaatg acaattttcc atggcatgta atggaaagca tatccgatgt ggataatgaa 1740
 aattgggatc gctataattc caaaattgtc cccttaagcg aactggaaaa gactctcatc 1800
 taa 1803

<210> 10
 <211> 236
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Terminador de Alcohol deshidrogenasa (ADH1)

<400> 10
 gcgaatttct tatgatttat gatttttatt attaaataag ttataaaaaa aataagtgta 60
 taciaaatttt aaagtgactc ttaggtttta aaacgaaaat tcttattctt gagtaactct 120
 ttcctgtagg tcaggttgct ttctcaggtg tagcatgagg tcgctcttat tgaccacatc 180
 tctaccggca tgccgagcaa atgcctgcaa atcgctcccc atttcaccca attgta 236

<210> 11
 15 <211> 2043
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Transcetolasa (TKL1)

<400> 11

ES 2 773 639 T3

atgactcaat ttactgacat tgataagcta gccgtctcca ccataagaat tttggctgtg 60
gacaccgtat ccaaggccaa ctcaggtcac ccaggtgctc cattgggtat ggcaccagct 120
gcgcacgttc tatggagtca aatgcgcatg aaccaacca acccagactg gatcaacaga 180
gatagatttg tcttgtctaa cggtcacgcg gtcgctttgt tgtattctat gctacatttg 240
actggttacg atctgtctat tgaagacttg aaacagttca gacagttggg ttccagaaca 300
ccaggtcatc ctgaatttga gttgccaggt gttgaagtta ctaccggtcc attaggtcaa 360
ggtatctcca acgctgttgg tatggccatg gctcaagcta accttgctgc cacttacaac 420
aagccaggct ttaccttgtc tgacaactac acctatgttt tcttgggtga cggttgtttg 480
caagaaggta tttcttcaga agcttcctcc ttggctggtc atttgaaat gggtaacttg 540
attgccatct acgatgacaa caagatcact atcgatggtg ctaccagtat ctattcgat 600
gaagatggtg ctaagagata cgaagcctac ggttgggaag ttttgtacgt agaaaatggt 660
aacgaagatc tagccggtat tgccaaggct attgctcaag ctaagttatc caaggacaaa 720
ccaactttga tcaaatgac cacaaccatt ggttacggtt ccttgcacgc cggctctcac 780
tctgtgcacg gtgcccatt gaaagcagat gatgttaaac aactaaagag caaattcgggt 840
ttcaaccag acaagtcctt tgttgttcca caagaagttt acgaccacta ccaaagaca 900
atthaaagc caggtgtcga agccaacaac aagtgaaca agttgttcag cgaataccaa 960
aagaaattcc cagaattag tgctgaattg gctagaagat tgagcggcca actaccgca 1020
aattgggaat ctaagttgcc aacttacacc gcccaaggact ctgccgtggc cactagaaa 1080
ttatcagaaa ctgttcttga ggatgtttac aatcaattgc cagagttgat tgggtgttct 1140
gccgatttaa caccttctaa cttgaccaga tggaaggaag cccttgactt ccaacctct 1200
tcttccggtt caggttaacta ctctggtaga tacatcagat acggtattag agaacacgct 1260
atgggtgcca tcatgaacgg tatttcagct ttcggtgcca actacaaacc atacggtggt 1320
actttcttga acttoggttt ttatgctgct ggtgccgtta gattgtccgc tttgtctggc 1380
caccagtta tttgggttgc tacacatgac tctatcggtg tcggtgaaga tgggtccaaca 1440
catcaaccta ttgaaacttt agcacacttc agatccctac caaacattca agtttgaga 1500
ccagctgatg gtaacgaagt ttctgccgcc tacaagaact ctttagaatc caagcact 1560
ccaagtatca ttgctttgtc cagacaaaac ttgccacaat tggaaggtag ctctattgaa 1620
agcgcttcta aggtgtggtta cgtactacaa gatgttgcta acccagatat tattttagt 1680
gctactggtt ccgaagtatc tttgagtgtt gaagctgcta agactttggc ogcaaagaac 1740
atcaaggctc gtgttgtttc totaccagat ttcttcaact ttgacaaaca acccctagaa 1800
tacagactat cagtcttacc agacaacgtt ccaatcatgt ctggtgaagt tttggctacc 1860
acatgttggg gcaaatcgc tcatcaatcc ttcggtattg acagatttg tgcctccggt 1920
aaggcaccag aagtcttcaa gttcttcggt ttcacccag aaggtgttgc tgaaagagct 1980
caaaagacca ttgcattcta taagggtgac aagctaattt ctcccttgaa aaaagctttc 2040
taa 2043

ES 2 773 639 T3

<210> 12
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Ribosa 5-fosfato epimerasa (RPE1)

<400> 12
 atggtcaaac caattatagc tcccagtatc cttgcttctg acttcgcaa cttgggttgc 60
 gaatgtcata aggtcatcaa cgccggcgca gattggttac atatcgatgt catggacggc 120
 cattttgttc caaacattac tctgggcaa ccaattgta cctccctacg tcgttctgtg 180
 ccacgccctg gcgatgctag caacacagaa aagaagccca ctgcgttctt cgattgtcac 240
 atgatggttg aaaatcctga aaaatgggtc gacgattttg ctaaagtgtg tgctgaccaa 300
 tttacgttcc actacgaggc cacacaagac cctttgcatt tagttaagt gattaagtct 360
 aaggcatca aagctgatg cgccatcaa cctggtactt ctggtgacgt tttatttgaa 420
 ctagctcctc atttggatat ggctcttgtt atgactgtgg aacctgggtt tggaggccaa 480
 aaattcatgg aagacatgat gccaaaagt gaaacttga gagccaagt tccccattg 540
 aatatccaag tcgatggtg tttgggcaag gagaccatcc cgaaagccgc caaagccggt 600
 gccaacgtta ttgtogctg taccagtgtt ttcactgcag ctgacccgca cgatgttatc 660
 10 tccttcatga aagaagaagt ctcgaaggaa ttgcgttcta gagatttgct agattag 717

<210> 13
 <211> 189
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Terminador de 3-Fosfato quinasa (PGK1)

20

<400> 13
 attgaattga attgaaatcg atagatcaat ttttttcttt tctctttccc catcctttac 60
 gctaaaataa tagtttattt tattttttga atatttttta tttatatacg tatatataga 120
 ctattattta tcttttaatg attattaaga tttttattaa aaaaaaattc gctcctcttt 180
 taatgcctt 189

25

<210> 14
 <211> 984
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Aldosa reductasa (GRE3)

<400> 14

ES 2 773 639 T3

atgtcttcac tggttactct taataacggt ctgaaaatgc ccctagtcgg cttagggtgc 60
 tggaaaattg acaaaaaagt ctgtgcgagt caaatattatg aagctatcaa attaggctac 120
 cgtctattcg atggtgcttg cgactacggc aacgaaaagg aagttggtga aggtatcagg 180
 aaagccatct ccgaaggtct tgtttctaga aaggatataat ttggtgtttc aaagtattgg 240
 aacaattttc accatcctga tcatgtaaaa ttagctttaa agaagacctt aagcgatatg 300
 ggacttgatt atttagacct gtattatatt cacttcccaa tcgccttcaa atatgttcca 360
 tttgaagaga aataccctcc aggattctat acgggcgag atgacgagaa gaaaggtcac 420
 atcaccgaag cacatgtacc aatcatagat acgtaccggg ctctggaaga atgtgttgat 480
 gaaggcttga ttaagtctat tgggtgttcc aactttcagg gaagcttgat tcaagattta 540
 ttacgtggtt gtagaatcaa gcccgaggct ttgcaaattg aacaccatcc ttatttgact 600
 caagaacacc tagttgagtt ttgtaaatta cacgatatcc aagtagttgc ttactcctcc 660
 ttcggtcctc aatcattcat tgagatggac ttacagttgg caaaaaccac gccaaactctg 720
 ttcgagaatg atgtaatcaa gaaggtctca caaaaccatc caggcagtac cacttcccaa 780
 gtattgctta gatgggcaac tcagagaggc attgccgtca ttccaaaatc ttccaagaag 840
 gaaaggttac ttggcaacct agaaatcgaa aaaaagttca cttaacgga gcaagaattg 900
 aaggatattt ctgcactaaa tgccaacatc agatttaatg atccatggac ctggttggat 960
 ggtaaattcc ccacttttgc ctga 984

<210> 15
 <211> 1032
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Recombinasa CRE

10

<400> 15
 ctaatcgcca tcttccagca ggcgcacat tgcccctggt tcaactatcca gggtagcgat 60
 atagttcatg acaatattta cattggtcca gccaccagct tgcatgatct ccggtattga 120
 aactccagcg cgggcatat ctcgcgcggc tccgacacgg gcaactgtgtc cagaccaggc 180
 caggtatctc tgaccagagt catccttagc gccgtaaadc aatcgatgag ttgcttcaaa 240

ES 2 773 639 T3

aatcccttcc agggcgcgag ttgatagctg gctggtggca gatggcgcg caacaccatt 300
 ttttctgacc cggcaaaaca ggtagttatt cggatcatca gctacaccag agacggaaat 360
 ccatcgctcg accagtttag ttacccccag gctaagtgcc ttctctacac ctgcggtgct 420
 aaccagcgtt ttcgttctgc caatatggat taacattctc ccaccgtcag tacgtgagat 480
 atctttaacc ctgacacctg caatttcggc tatacgtaac aggggtgttat aagcaatccc 540
 cagaaatgcc agattacgta taccctggca gcgatcgcta ttttccatga gtgaacgaac 600
 ctggtcgaaa tcagtgcggt cgaacgctag agcctgtttt gcacggtcac cggcatcaac 660
 gttttctttt cggatccgcc gcataaccag tgaacagca ttgctgtcac ttggtcgtgg 720
 cagcccggac cgacgatgaa gcatgtttag ctggcccaaa tgttgctgga tagtttttac 780
 tgccagaccg cgcgcctgaa gatatagaag ataatcgca acatcttcag gttctgcggg 840
 aaaccatttc cggttattca acttgacca tgccgccac gaccggcaaa cggacagaag 900
 cttttccag gtatgctcag aaaacgcctg gcgatccctg aacatgtcca tcaggttctt 960
 gcgaacctca tcaactggtt catcgaccgg taatgcaggc aaattttggg gtacggtcag 1020
 taaattggac at 1032

<210> 16
 <211> 327
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LTR de retrotransposón Ty1

10 <400> 16
 ctgagagatt ggtgaattht gagatgattg taggcattcc attggtgatc aaggctacaa 60
 tattatgtat acagaatata ctaaaagttc tcctcgaggg tagaggaatc ctcaaagggg 120
 aagcgatatt tctacataat attattacga ttattcctca ttccgtttta tatgtttcat 180
 taccctatta cattatcaat ccttgcactt cagcttctc taacttcgat gacagtttct 240
 cataccttat gtcacgtct aacaccgtat atgataatat actggtagtg tgactactag 300
 tttatagacg atagttgatt tttattc 327

<210> 17
 15 <211> 2216
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> LEU2 (ORF + promotor y terminador)

<400> 17
 tcgaggagaa cttctagtat atccacatac ctaatattat tgccttatta aaaatggaat 60

ES 2 773 639 T3

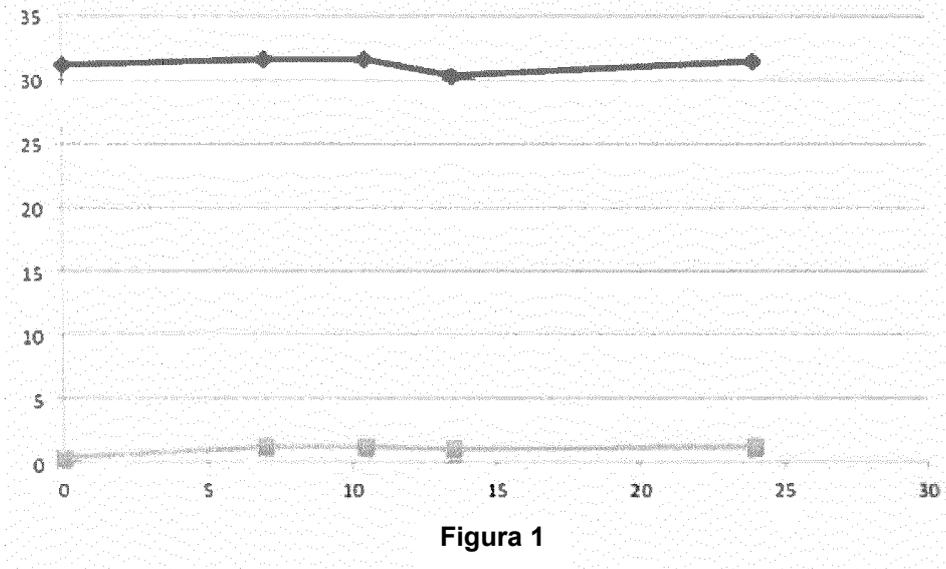
cccaacaatt acatcaaaat ccacattctc ttcaaaatca attgtcctgt acttccttgt	120
tcatgtgtgt tcaaaaacgt tatatttata ggataattat actctatttc tcaacaagta	180
attggttgtt tggccgagcg gtctaaggcg cctgattcaa gaaatatctt gaccgcagtt	240
aactgtggga atactcaggt atcgttaagat gcaagagttc gaatctctta gcaaccatta	300
tttttttctt caacataacg agaacacaca ggggcgctat cgcacagaat caaattcgat	360
gactggaaat tttttgtaa tttcagaggt cgcctgacgc atataccttt ttcaactgaa	420
aaattgggag aaaaaggaaa ggtgagagggc cgggaaccggc ttttcatata gaatagagaa	480
gcgttcatga ctaaagtctt gcatcacaat acttgaagtt gacaatatta ttaaggacc	540
tattgttttt tccaataggt ggtttagcaat cgtcttactt tctaactttt cttacctttt	600
acatttcagc aatatatata tatatttcaa ggatatacca ttctaagtgc tgcccctaag	660
aagatcgtcg ttttccagc tgaccacggt ggtcaagaaa tcacagccga agccattaag	720
gttcttaaag ctatttctga tgttcgttcc aatgtcaagt tcgatttcga aaatcattta	780
attggtgggt ctgctatcga tgctacaggt gtcccacttc cagatgagggc gctggaagcc	840
tccaagaaggt ttgatgccgt tttgttaggt gctgtgggtg gtccctaaatg ggtaccgggt	900
agtgttagac ctgaacaagg tttactaaaa atccgtaaag aacttcaatt gtacgccaac	960
ttaagacat gtaactttgc atccgactct cttttagact tatctccaat caagccacaa	1020
tttctaaag gtactgactt cgttctgtgc agagaattag tgggaggtat ttactttggt	1080
aagagaaagg aagacgatgg tgatggtgtc gcttgggata gtgaacaata caccgttcca	1140
gaagtgcaa gaatcacaag aatggccgct ttcattggccc tacaacatga gccaccattg	1200
cctatttgggt ccttggataa agctaagtgt ttggcctctt caagattatg gagaaaaact	1260
gtggaggaaa ccatcaagaa cgaattccct acattgaagg ttcaacatca attgattgat	1320
tctgcccga tgatcctagt taagaaccca acccacctaa atgggtattat aatcaccagc	1380
aacatgtttg gtgatatcat ctccgatgaa gcctccgta tcccaggttc cttgggtttg	1440
ttgccatctg cgtccttggc ctctttgcca gacaagaaca ccgcatttgg tttgtacgaa	1500
ccatgccacg gttctgctcc agatttgcca aagaataagg ttgaccctat cgcactatc	1560
ttgtctgctg caatgatggt gaaattgtca ttgaacttgc ctgaagaagg taaggccatt	1620
gaagatgcag ttaaaaagggt tttggatgca ggtatcagaa ctgggtgattt aggtggttcc	1680
aacagtacca ccgaagtcgg tgatgctgtc gccgaagaag ttaagaaaat ccttgcttaa	1740
aaagattctc ttttttatg atatttgtac ataaacttta taaatgaaat tcataataga	1800
aacgacacga aattacaaaa tggaatatgt tcatagggta gacgaaacta tatacgcaat	1860
ctacatacat ttatcaagaa ggagaaaaag gaggatagta aaggaataca ggtaagcaaa	1920
ttgatactaa tggctcaacg tgataaggaa aaagaattgc actttaacat taatattgac	1980
aaggaggagg gcaccacaca aaaagttagg tgtaacagaa aatcatgaaa ctacgattcc	2040
taatttgata ttggaggatt ttctctaaaa aaaaaaaaaat acaacaata aaaaactc	2100
aatgacctga ccatttgatg gagtttaagt caataccttc ttgaaccatt tcccataatg	2160
gtgaaagttc cctcaagaat tttactctgt cagaaacggc cttacgacgt agtcga	2216

REIVINDICACIONES

1. Un casete de expresión para transformar una célula eucariótica **caracterizado porque** comprende una combinación de los siguientes casetes de expresión:
- 5 a) un casete de expresión que comprende el gen que codifica la xilosa isomerasa de secuencia **SEQ ID NO: 1**, el promotor TDH1 de secuencia de nucleótidos **SEQ ID NO: 2**, y el terminador TDH1 de secuencia de nucleótidos **SEQ ID NO: 3**;
- 10 b) un casete de expresión que comprende el promotor ADH1 representado por la secuencia **SEQ ID NO: 8**, el gen XKS1 representado por la secuencia **SEQ ID NO: 9** y el terminador ADH1 representado por la secuencia **SEQ ID NO: 10**;
- 15 c) un casete de expresión que comprende el promotor TDH1 de secuencia de nucleótidos **SEQ ID NO: 2**, el gen TAL1 de secuencia **SEQ ID NO: 5**, el gen del terminador TDH1 de secuencia **SEQ ID NO: 3**, seguido por el promotor PGK1 de secuencia **SEQ ID NO: 6**, del gen RK11 (**SEQ ID NO: 7**) y terminador de la secuencia de nucleótidos **SEQ ID NO: 13**; y
- 20 d) un casete de expresión que comprende el promotor TDH1 de secuencia **SEQ ID NO: 02**, el gen TKL1 de secuencia **SEQ ID NO: 11**, el gen codificante de la Ribosa 5-fosfato epimerasa (**SEQ ID NO: 7**), el terminador TDH1 de secuencia **SEQ ID NO: 3**, seguido por el promotor PGK1 de secuencia **SEQ ID NO: 6**, el gen RPE1 de secuencia **SEQ ID NO: 12** y el terminador PGK1 de secuencia **SEQ ID NO: 13**;
- en donde dicho casete de expresión es funcional en la célula eucariótica.
2. Un casete de expresión, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho promotor o dichos promotores son constitutivos o naturalmente inducibles.
- 25 3. Un procedimiento para transformar una célula eucariótica, **caracterizado por** la introducción, en la célula que se va a transformar, de al menos un casete de expresión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 30 4. Un procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 3, adicionalmente **caracterizado porque** comprende la inactivación o delección del gen GRE3 (**SEQ ID NO: 14**) en el genoma de dicha célula eucariótica.
5. Un microorganismo modificado genéticamente, **caracterizado porque** comprende al menos un casete de expresión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 35 6. Un microorganismo, de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** uno o más de dichos casetes de expresión están presentes en la región de los 5 mil primeros pares de bases contados desde el centrómero tanto en dirección *aguas arriba* como *aguas abajo*, y puede estar incluso inmediatamente *aguas arriba*, inmediatamente *aguas abajo* o ambas a la vez.
- 40 7. Un microorganismo, de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** las secuencias promotoras, las secuencias codificantes y las secuencias terminadoras de los casetes de expresión son estables en el genoma del microorganismo y/o están presentes en al menos 5 copias en el genoma del microorganismo.
- 45 8. Un microorganismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, **caracterizado porque** el gen GRE3 (**SEQ ID NO: 14**) está desactivado en, o eliminado de su genoma.
9. Un microorganismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, **caracterizado porque** ser una levadura del género seleccionado del grupo que consiste en: *Saccharomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Hansenula* y *Yarrowia*.
- 50 10. Un microorganismo, de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** el microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae* DSM28739.
- 55 11. Un microorganismo modificado genéticamente, **caracterizado porque** ser *Saccharomyces cerevisiae* DSM28739.
12. Un procedimiento de producción de biocombustibles y/o productos bioquímicos, **caracterizado porque** comprende una etapa de cultivo del microorganismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5-11.
- 60 13. Un procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado porque** el rendimiento del procedimiento es de al menos 0,45 gramos de etanol producido por gramo de xilosa consumido por el microorganismo en medio sintético que comprende xilosa como fuente de carbono.
14. Un procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, **caracterizado porque** la productividad volumétrica

es de al menos 0,67 gramos de etanol producido por litro cada hora, cuando se encuentra en un medio sintético que comprende xilosa como fuente de carbono.

- 5 15. Un procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, **caracterizado porque** el microorganismo es el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* DSM28739.



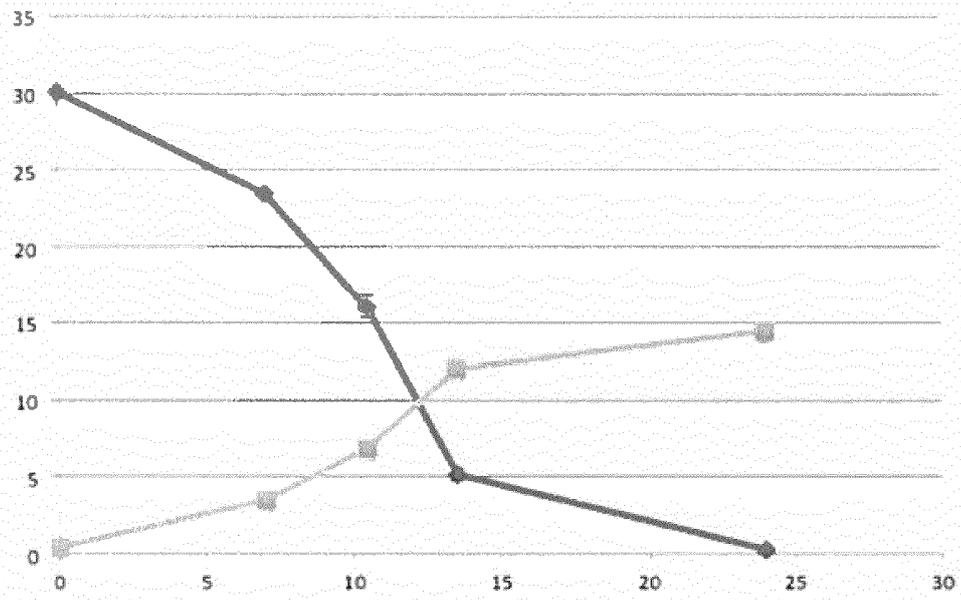


Figura 2

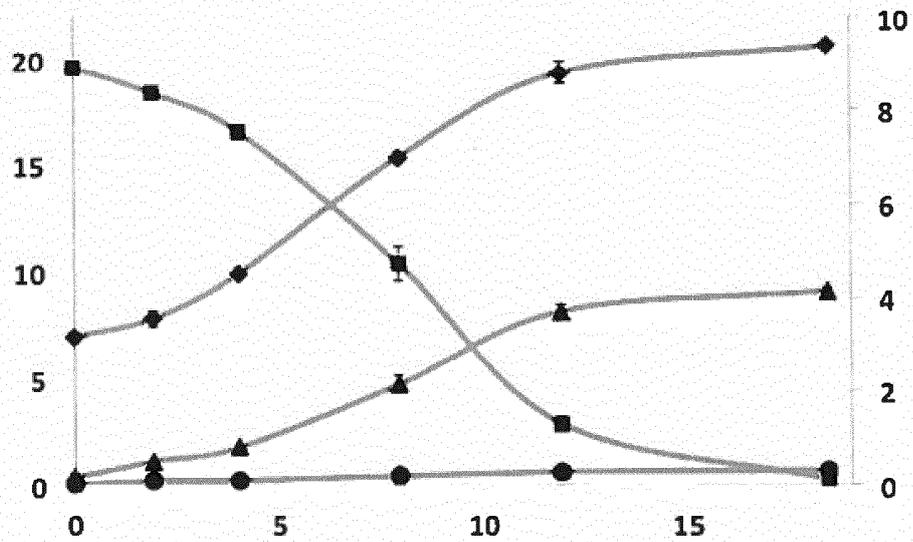


Figura 3

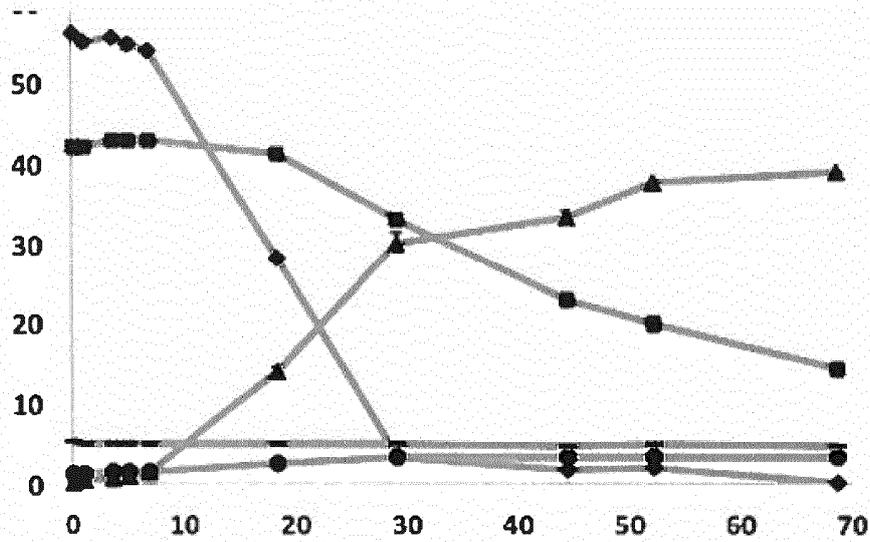


Figura 4

TCGAGGAGAACTTCTAGTATATCCACATACCTAATATTATTGCCTTATTAAAAATGGAA
 TCCCAACAATTACATCAAAATCCACATTCTCTTCAAATCAATTGTCCTGTACTTCCTT
 GTTCATGTGTGTTCAAAAACGTTATATTTATAGGATAATTATACTCTATTTCTCAACAA
 GTAATTGGFTGTTTGGCCGAGCGGTCTAAGGCGCCTGATTCAAGAAATATCTTGACCGC
 AGTTAACTGTGGGAATACTCAGGTATCGTAAGATGCAAGAGTTCGAATCTCTTAGCAAC
 CATTATTTTTTTTCTCAACATAACGAGAACACACAGGGGCGCTATCGCACAGAATCAAA
 TTCGATGACTGGAAATTTTTGTTAATTTTCAAGAGTTCGCTGACGCATATACCTTTTTT
 AACTGAAAAATTGGGAGAAAAAGGAAAGGTGAGAGGCCGGAACCGGCTTTTCATATAGA
 ATAGAGAAGCGTTCATGACTAAATGCTTGCATACAATACTTGAAGTTGACAATATTAT
 TTAAGGACCTATTGTTTTTTCCAATAGGTGGTTAGCAATCGTCTTACTTTCTAACTTTT
 CTTACCTTTTACATTTTCAAGCAATATATATATATATTTTCAAGGATATACCATTCTAATGT

CTGCCCTAAGAAGATCGTCGTTTTGCCAGGTGACCACGTTGGTCAAGAAATCACAGCC
 GAAGCCATTAAGGTTCTTAAAGCTATTTCTGATGTTTCGTTCCAATGTCAAGTTTCGATTT
 CGAAAATCATTTAATTGGTGGTGCTGCTATCGATGCTACAGGTGTCCCACTTCCAGATG
 AGGCGCTGGAAGCCTCCAAGAAGGTTGATGCCGTTTTGTTAGGTGCTGTGGGTGGTCCCT
 AAATGGGGTACCGGTAGTGTTAGACCTGAACAAGGTTTACTAAAAATCCGTAAAGAACT
 TCAATTGTACGCCAACCTAAGACCATGTAACCTTGCATCCGACTCTCTTTTAGACTTAT
 CTCCAATCAAGCCACAATTTGCTAAAGGTACTGACTTCGTTGTTGTGAGAGAATTAGTG
 GGAGGTATTTACTTTGGTAAGAGAAAGGAAGACGATGGTGTGCTGCTTGGGATAG
 TGAACAATACACCGTTCCAGAAGTGCAAAGAATCACAAGAATGGCCGCTTTCATGGCCC
 TACAACATGAGCCACCATTGCCTATTTGGTCCTTGATAAAGCTAATGTTTTGGCCTCT
 TCAAGATTATGGAGAAAACTGTGGAGGAAACCATCAAGAACGAATTCCTACATTGAA
 GGTTCAACATCAATTGATTGATTCTGCCGCCATGATCCTAGTTAAGAACCCAACCCACC
 TAAATGGTATTATAATCACCAGCAACATGTTTGGTGTATCATCTCCGATGAAGCCTCC
 GTTATCCCAGGTTCTTGGGTTTGTGTCATCTGCCTTGGCCTCTTTGCCAGACAA
 GAACACCGCATTTGGTTTGTACGAACCATGCCACGGTCTGCTCCAGATTTGCCAAAGA
 ATAAGGTTGACCCTATCGCCACTATCTTGTCTGCTGCAATGATGTTGAAATTGTCATTG
 AACTTGCCTGAAGAAGGTAAGGCCATTGAAGATGCAGTTAAAAAGGTTTTGGATGCAGG
 TATCAGAACTGGTGATTTAGGTGGTTCCAACAGTACCACCGAAGTCCGTGATGCTGTCC
 CCGAAGAAGTTAAGAAAATCCTTGCTTAAAAAGATTCTCTTTTTTTATGATATTTGTAC
 ATAAACTTTATAAATGAAATTCATAATAGAAACGACACGAAATTACAAAATGGAATATG
 TTCATAGGGTAGACGAAACTATATACGCAATCTACATACATTTATCAAGAAGGAGAAAA
 AGGAGGATAGTAAAGGAATACAGGTAAGCAAATTGATACTAATGGCTCAACGTGATAAG
 GAAAAAGAATTGCACTTTAACATTAATATTGACAAGGAGGAGGGCACACACAAAAAGT
 TAGGTGTAACAGAAAATCATGAAACTACGATTCCTAATTTGATATTGGAGGATTTTCTC
 TAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
 TTAAGTCAATACCTTCTTGAACCATTTCCATAATGGTGAAGTTCCCTCAAGAATTTT
 ACTCTGTCCAGAAACGGCCTTACGACGTAGTCGA

Figura 5

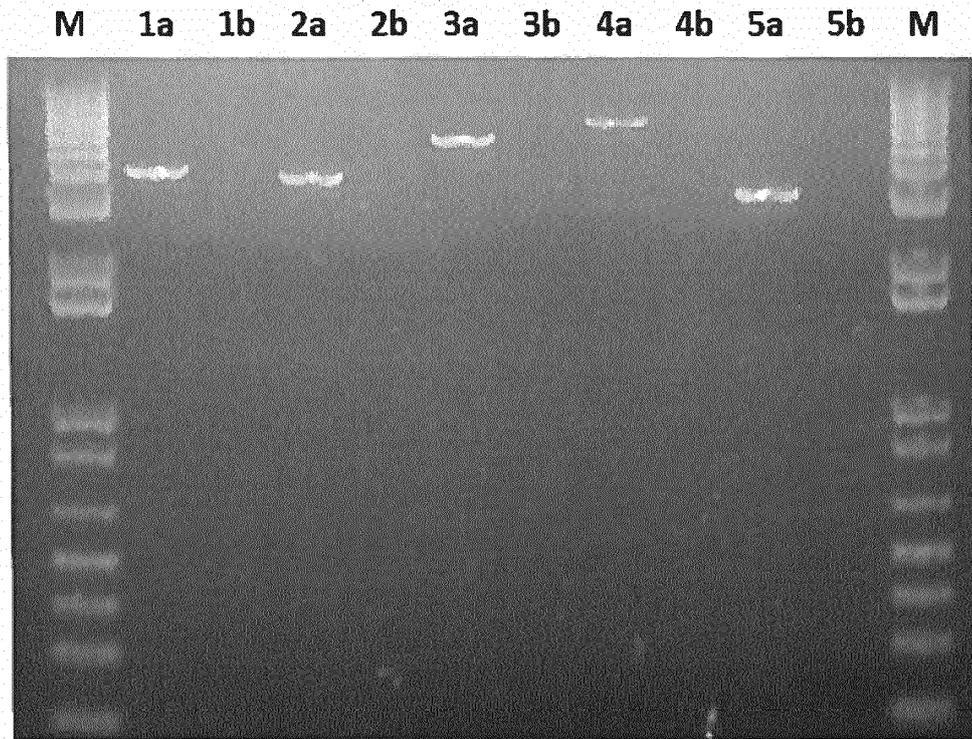


Figura 6

