

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 361**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 9/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/02</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/10</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/88</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/52</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/18</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2015 PCT/EP2015/066920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2015 E 15749743 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3172330**

54 Título: **Cepas de microorganismo para la producción de 2,3-butanodiol**

30 Prioridad:

**25.07.2014 EP 14306202**

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

**30.07.2020**

73 Titular/es:

**ALDERYS (100.0%)  
86 Rue de Paris  
91400 Orsay, FR**

72 Inventor/es:

**BREMOND, MÉLANIE;  
JAILLARDON, KARINE;  
LOUIS, DOMINIQUE y  
THOMAS, DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 776 361 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

Cepas de microorganismo para la producción de 2,3-butanodiol

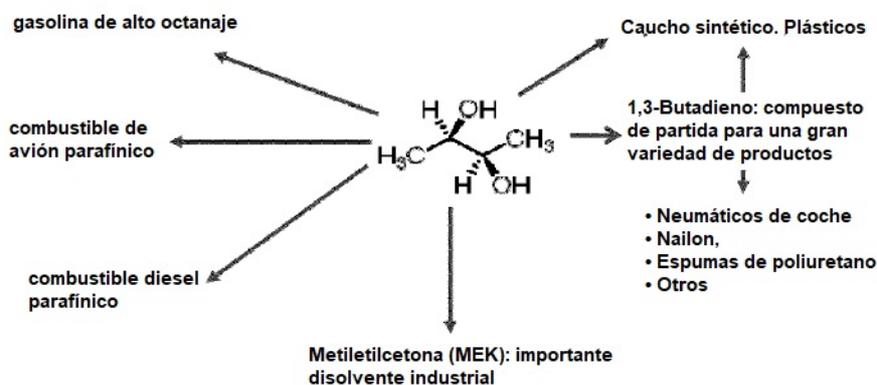
### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una levadura recombinante que tiene una actividad piruvato descarboxilasa reducida. La levadura recombinante se modifica para mejorar la producción de 2,3-butanodiol en comparación con la levadura no modificada. La invención también proporciona métodos para usar dicho microorganismo para producir 2,3-butanodiol.

### Antecedentes

10 2-3-Butanodiol (2,3-BDO) es un compuesto químico base multi-funcional que puede usarse para producir otros compuestos químicos a granel y sintetizar productos diversos, tales como fármacos, cosméticos y disolventes industriales (Celinska y Grajek, 2009; Syu, 2001).

Más particularmente, 2,3-BDO pueden usarse en considerables aplicaciones industriales en mercados importantes, como se resume a continuación en la presente memoria.



15 Dos de las aplicaciones más interesantes de 2,3-BDO son la metiletilcetona (disolvente MEK) y el butadieno (BDE), un monómero principal en la fabricación de caucho sintético y neumáticos.

La síntesis química tradicional de 2,3-BDO se enfrenta al inconveniente de la deficiencia de petróleo y la contaminación ambiental, mientras que la fabricación de 2,3-BDO está actualmente creciendo aún a una velocidad anual de 4-7% (Jiayang et al., 2006).

20 Muchos compuestos químicos que podrían producirse solo mediante procesos químicos tradicionales en el pasado pueden ahora tener el potencial de generarse biológicamente, usando fuentes renovables (Danner y Braun, 1999; Hatti-Kaul et al., 2007). La producción microbiana de 2,3-BDO es uno de dichos ejemplos. El interés en este bioproceso ha aumentado notablemente porque 2,3-BDO tiene un gran número de aplicaciones industriales, como se menciona anteriormente, y la producción microbiana aliviará la dependencia del suministro de petróleo para la producción de compuestos químicos base (Celmska y Grajek, 2009; Wu et al., 2008). *Saccharomyces cerevisiae* es una base especialmente bien adaptada para dichos bioprocesos (Nielsen et al., 2013).

25 Sin embargo, en este momento, el 2,3-BDO producido mediante procesos microbianos es un compuesto raramente usado a escala industrial, debido a sus altos costes de producción notablemente unidos a pobre rendimiento de producción. La industria química usa de hecho preferentemente otros compuestos químicos C4, tal como 1,4-BDO y ácido succínico.

30 Con respecto a la producción microbiana de 2,3-BDO, la mayoría de estudios usaron bacterias, tales como *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* y *Paenibacillus polymyxa* para producir 2,3-BDO (Cho et al., 2012; Han et al., 2013; Hassler et al., 2012; Jung et al., 2012). Aunque estas bacterias son capaces de producir 2,3-BDO con altos rendimientos y productividades, se clasifican sin embargo como bacterias patógenas de manera que la fermentación a gran escala sería difícil en términos de seguridad e industrialización (Celinska y Grajek, 2009).

35 La producción de 2,3-BDO mediante un microorganismo GRAS (es decir generalmente reconocido como seguro) sería por consiguiente deseable. La levadura, y más particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, es un

microorganismo apropiado en este contexto. *S. cerevisiae* se conoce por producir 2,3-BDO de forma natural, pero el rendimiento y la productividad de la producción de 2,3-BDO son pobres. La producción de etanol es ciertamente la barrera más obvia para la producción eficiente de 2,3-BDO en *S. cerevisiae* porque el piruvato, un intermedio clave, se usa preferentemente para producir etanol más que 2,3-BDO.

- 5 Para minimizar la producción de etanol y maximizar la producción de 2,3-BDO, se ha utilizado un mutante deficiente en piruvato descarboxilasa (Pdc) para la producción de 2,3-BDO. Sin embargo, las cepas deficientes de Pdc tienen defectos potenciales para las fermentaciones industriales (Flikweert et al., FEMS Microbiology Letters 174, 1999 73-79).

10 Los documentos WO 2013/076144, WO 2011/040901 y US 2011/0124060 describe el microorganismo que no se da de forma natural que tiene una ruta de 2,3-BDO mejorada. Alterándose las rutas de producción de etanol y acetato, los documentos US 2011/0124060 y WO 2013/076144 describen que lleva a un estado redox desequilibrado a lo que la solución propuesta consiste en aumentar la actividad de una enzima dependiente de NADH y, posiblemente, la acumulación de NAD<sup>+</sup>.

15 El documento WO 2011/041426 describe una célula de levadura recombinante para la disponibilidad aumentada de piruvato y la represión de glucosa reducida permite la producción aumentada de producto partiendo de piruvato tal como 2,3-butanodiol. Sin embargo, la cepa no expresa una enzima dependiente de NADH de equilibrio redox específica.

20 En Soo-Jung Kim et al. (Bioresource Technology 146 (2013) 274-281) se construyó una cepa deficiente en Pdc y evolucionó para el cultivo en glucosa. La cepa deficiente en Pdc evolucionada se genotipó para identificar los cambios genéticos necesarios que permiten a la cepa deficiente en Pdc cultivarse en alta concentración de glucosa. Sin embargo, estas cepas crecen lentamente se comparan a cepas que han retenido alguna actividad pdc. Posteriormente, la ruta biosintética de 2,3-BDO a partir de *Bacillus subtilis* se introdujo en la cepa deficiente en Pdc evolucionada para producir 2,3-BDO a partir de glucosa de forma eficiente en *S. cerevisiae*. Esta cepa se presenta como que produce 96,2 g/L después de 244 h de cultivo, con un rendimiento de 2,3-BDO (0,28 g de 2,3-BDO/g de glucosa) y productividad volumétrica (0,39 g de 2,3-BDO/Lh<sup>-1</sup>). Sin embargo, este rendimiento de 2,3-BDO no parece apropiado para ser económicamente viable desde un punto de vista industrial.

30 Por lo tanto, por razones obvias, para mejorar la producción de 2,3-BDO a través de procesos microbianos, y más particularmente de la conversión de piruvato a 2,3-BDO, sigue estando un objetivo constante. Más particularmente, hay aún una necesidad de un microorganismo recombinante estable que tenga un rendimiento de producción mejorado de 2,3-butanodiol, en particular compatible con los requisitos de la industrialización.

### Compendio

La presente invención se refiere a una levadura recombinante que tiene una actividad de piruvato descarboxilasa reducida, en cuyo genoma se ha insertado:

- uno o más ácidos nucleicos que codifican una acetolactato sintasa o ALS,
- 35 - uno o más ácidos nucleicos que codifican una acetolactato descarboxilasa o ALD,
- uno o más ácidos nucleicos que codifican una butanodiol deshidrogenasa o BDH, y
- una o más copias de unos ácidos nucleicos que codifican una NADH oxidasa o NOXE,

40 Seleccionándose dichas una o más copias de unos ácidos nucleicos que codifican una NADH oxidasa o NOXE del grupo que consiste en secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos 78%, preferiblemente al menos 80%, de identidad de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:23 que representa la actividad biológica deseada, y

45 Dicha actividad de piruvato descarboxilasa se reduce mediante (i) la alteración de al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa insertando en dicho al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa al menos un constructo de ADN exógeno, (ii) mutaciones en regiones reguladoras, (iii) mutaciones en un codón de partida, principalmente sustituyendo AUG por GUG, (iv) mutaciones en secuencias de codificación que alteran la actividad enzimática (v) mutaciones, inserciones o supresión en la secuencia de codificación que altera la estabilidad de la proteína y (vi) mutaciones que alteran la vida media del ARNm de la piruvato descarboxilasa.

Según una realización particular, la levadura recombinante según la presente descripción puede comprender uno o más constructos de ADN seleccionados en un grupo que comprende las siguientes fórmulas:

- 50 (I) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-3' y 5'-[Gen 2]<sub>x2</sub>-3' y 5'-[Gen 3]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',
- (II) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-[Gen 3]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',

(III) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-3' y 5'-[Gen 3]<sub>x3</sub>-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',

(IV) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-[Gen 3]<sub>x3</sub>-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3', y

Una combinación de las mismas,

En las que:

- 5 - "Gen 1" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE;
- "Gen 2" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferente del gen 1;
- "Gen 3" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferente de los genes 1 y 2;
- 10 - "Gen 4" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferente de los genes 1 a 3;
- "ALS" es un ácido nucleico que codifica una acetolactato sintasa;
- "ALD" es un ácido nucleico que codifica una acetolactato descarboxilasa;
- "BDH" es un ácido nucleico que codifica una butanodiol deshidrogenasa;
- 15 - "NOXE" es un ácido nucleico que codifica una NADH oxidasa;
- cada uno de "x1", "x2", "x3" y "x4", uno independientemente de los demás, representa un número entero que oscila de 0 a 50, preferiblemente de 0 a 20, lo más preferiblemente uno, y

Con tal que dicha levadura recombinante comprenda al menos un ácido nucleico que codifique para cada uno de ALS, ALD, BDH y NOXE.

- 20 Preferiblemente, cada uno entre "x1", "x2", "x3" y "x4", independientemente los unos de los otros, representa un número entero que oscila de 0 a 10, más particularmente que oscila de 0 a 5, en particular que oscila de 0 a 3, y aún mejor representa un número entero igual a 1.

Según otra realización particular, la levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos uno, preferiblemente al menos dos, constructo(s) de ADN de fórmula (II) mencionada anteriormente, idénticos o diferentes, en los que "Gen 4" significa un ácido nucleico que codifica NADH oxidasa.

- 25 Según aún otra realización particular, la levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos uno, preferiblemente al menos dos, constructo(s) de ADN de fórmula (IIa), idénticos o diferentes, en los que cada fórmula (IIa) tiene la siguiente fórmula:

30 (IIa) 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-Gen 1-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-Gen 1-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-Gen 2-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-Gen 3-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-Gen 4-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x4</sub>-3',

En la que:

- Gen 1, Gen 2, Gen 3, Gen 4, "x1", "x2", "x3" y "x4" son tal como se definen anteriormente;
- "x5" representa un número entero igual a 0 o 1;
- "y1", "y2", "z1" y "z2", uno independientemente de los otros, representan un número entero igual a 0 o 1;
- 35 - cuando dicha levadura recombinante comprende al menos dos constructos de ADN de fórmula (IIa), entonces "x1" a "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" pueden ser idénticos o diferentes;
- "prom 1" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 1;
- "prom 2" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 2;
- "prom 3" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 3;
- 40 - "prom 4" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 4;
- "prom 5" es una secuencia reguladora que controla la expresión del Gen 1, siendo dicha prom5 idéntica o diferente de prom1;

## ES 2 776 361 T3

- "term1" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 1;

- "term2" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 2;

5 - "term3" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 3;

- "term4" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 4; y

10 - "term5" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión del Gen 1, siendo dicho term5 idéntico o diferente de term1.

Según otra realización particular, la levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos uno, preferiblemente al menos dos, constructo(s) de ADN de fórmula (IIb), idénticos o diferentes, en los que cada fórmula (IIb) tiene la siguiente fórmula:

15 (IIb)  $5'-[(\text{prom}5)_{y1}\text{-ALS-term}5]_{x5}\text{-}[\text{prom}1\text{-ALS-term}1]_{x1}\text{-}[\text{prom}2\text{-ALD-term}2]_{x2}\text{-}[\text{prom}3\text{-BDH-(term}3)_{z1}]_{x3}\text{-}3'$  y  $5'-[(\text{prom}4)_{y2}\text{-NOXE-(term}4)_{z2}]_{x4}\text{-}3'$

En la que:

- ALS, ALD, BDH, NOXE, "x1", "x2", "x3", "x4", "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" son tal como se definen anteriormente;

- cuando dicha levadura recombinante comprende al menos dos constructos de ADN de fórmula (IIb), entonces "x1" a "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" pueden ser idénticos o diferentes;

20 - "prom 1" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa;

- "prom 2" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato descarboxilasa;

25 - "prom 3" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la butanodiol deshidrogenasa;

- "prom 4" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la NADH oxidasa;

- "prom 5" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa, siendo dicha prom5 idéntica o diferente de prom1;

30 - "term1" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa;

- "term2" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato descarboxilasa;

- "term3" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la butanodiol deshidrogenasa;

35 - "term4" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la NADH oxidasa; y

- "term5" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa, siendo dicha term5 idéntica o diferente de term1.

40 Según otra realización particular, la levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos dos constructos de ADN de fórmula (II), (IIa) o (IIb), con tal que todas las copias de ácido nucleico de NOXE estén situadas en uno solo de al menos dos constructos de ADN de fórmula (II), (IIa) o (IIb).

Según otra realización particular, la levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos dos, preferiblemente estrictamente dos, constructos de ADN de las siguientes fórmulas (IIc) y (IId):

45 (IIc)  $5'-[(\text{prom}5)_{y1}\text{-ALS-term}5]_{x5}\text{-}[\text{prom}1\text{-ALS-term}1]_{x1}\text{-}[\text{prom}2\text{-ALD-term}2]_{x2}\text{-}[\text{prom}3\text{-BDH-(term}3)_{z1}]_{x3}\text{-}3'$  y  $5'-[(\text{prom}4)_{y2}\text{-NOXE-(term}4)_{z2}]_{x6}\text{-}3'$ ; y

(IIc) 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-ALS-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-ALS-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-ALD-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-BDH-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-NOXE-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x7</sub>-3'; y

En las que:

- 5 - ALS, ALD, BDH, NOXE, "prom1", "prom2", "prom3", "prom4", "prom5", "term1", "term2", "term3", "term4", "term5", "x1", "x2", "x3", "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" son como se definen anteriormente;
- siendo "x1" a "x3" para cada fórmula (IIc) y (IIc) idénticos o diferentes;
- siendo "x1" a "x3", "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" para cada fórmula (IIc) y (IIc) idénticos o diferentes; y
- "x6" y "x7" representan números enteros que oscilan de 0 a 50, preferiblemente de 0 a 20, preferiblemente de 0 a 12, más particularmente de 2 a 5, preferiblemente de 3 a 4, y mejor aún igual a 3, con tal que solo uno entre "x6" y "x7" represente 0.

La presente invención también está relacionada con un uso de una levadura recombinante según la presente invención, para la producción de 2,3-butanodiol (BDO) y/o derivados directos del mismo.

En particular, dichos derivados directos de 2,3-butanodiol (BDO) pueden seleccionarse del grupo que consiste en butanodieno (BDE), metiletilcetona (MEK) o una mezcla de los mismos.

- 15 La presente invención también se refiere a un método para producir 2,3-butanodiol (BDO), comprendiendo dicho método las etapas de:
  - (a) cultivar una levadura recombinante según la presente invención en un medio de cultivo apropiado; y
  - (c) recuperar el 2,3-butanodiol (BDO).

- 20 Preferiblemente, el medio de cultivo dicho comprende una fuente de carbono, preferiblemente seleccionada de un grupo que comprende glucosa y sacarosa.

### Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la ruta metabólica en una cepa de levadura recombinante para así sustituir la producción de etanol a favor de 2,3-BDO.

### Descripción detallada

- 25 Definiciones

Los términos 2,3-butanodiol, 2,3-BDO o BDO se usan de forma intercambiable en la presente descripción y se refieren a butano-2,3-diol, también denominado dimetilenglicol.

- 30 El término "microorganismo", como se usa en la presente memoria, se refiere a una levadura que no está modificada artificialmente. El microorganismo puede ser "dador" si proporciona elemento genético para integrarse en el microorganismo "aceptor" que expresará este elemento genético extraño o si se usa como herramienta para construcciones genéticas o expresiones de proteína. El microorganismo de la invención se elige entre levadura que expresa genes para la biosíntesis de 2,3-butanodiol.

- 35 El término "microorganismo recombinante" o "microorganismo modificado genéticamente" o "levadura recombinante" o "levadura modificada genéticamente", como se usa en la presente memoria, se refiere a una levadura modificada genéticamente o diseñada genéticamente. Esto significa, según el significado normal de estos términos, que el microorganismo de la invención no se encuentra en la naturaleza y se modifica o por introducción o por supresión o por modificación de elementos genéticos procedentes del microorganismo equivalente encontrado en la naturaleza. Puede también modificarse forzando el desarrollo y evolución de nuevas rutas metabólicas combinando la mutagénesis dirigida y la evolución bajo presión de selección específica (véase por ejemplo el documento WO 40 2004/076659).

- 45 Un microorganismo puede modificarse para expresar genes exógenos si estos genes se introducen en el microorganismo con todos los elementos que permiten su expresión en el microorganismo huésped. Un microorganismo puede modificarse para modular el nivel de expresión de un gen endógeno. La modificación o "transformación" del microorganismo, como la levadura, con ADN exógeno es una tarea rutinaria para los expertos en la técnica. En particular, una modificación genética de un microorganismo según la invención, más particularmente la(s) modificación(ones) genética(s) definida(s) en la presente memoria, puede(n) realizarse usando sistemas CRISPR-Cas, como se describe en DiCarlo et al. (Nucl. Acids Res., vol. 41, núm. 7, 2013:4336-4343).

El término "gen endógeno" significa que el gen estaba presente en el microorganismo antes de cualquier modificación genética, en la cepa de tipo salvaje. Los genes endógenos pueden sobreexpresarse introduciendo

secuencias heterólogas además de, o para sustituir elementos reguladores endógenos, o introduciendo una o más copias suplementarias del gen en el cromosoma o un plásmido. Los genes endógenos también pueden modificarse para modular su expresión y/o actividad. Por ejemplo, las mutaciones pueden introducirse en la secuencia de codificación para modificar el producto génico o pueden introducirse secuencias heterólogas además de o para sustituir elementos reguladores endógenos. La modulación de un gen endógeno puede dar por resultado la sobre-regulación y/o mejora de la actividad del producto génico, o de forma alternativa, la bajo-regulación y/o atenuación de la actividad del producto génico endógeno. Otra forma para mejorar la expresión de genes endógenos es introducir una o más copias suplementarias del gen en el cromosoma o un plásmido.

El término "gen exógeno" significa que el gen se introdujo en un microorganismo, por medios bien conocidos por el experto en la técnica, mientras que este gen no se da de forma natural en el microorganismo de tipo salvaje. El microorganismo puede expresar genes exógenos si estos genes se introducen en el microorganismo con todos los elementos que permiten su expresión en el microorganismo huésped. Transformar microorganismos con ADN exógeno es una tarea rutinaria para el experto en la técnica. Los genes exógenos pueden integrarse en el cromosoma huésped, o expresarse de forma extra-cromosómica a partir de plásmidos o vectores. Una variedad de plásmidos, que difieren con respecto a su origen de replicación y su número de copias en la célula, se conocen todos en la técnica. La secuencia de genes exógenos puede adaptarse para su expresión en el microorganismo huésped. De hecho, el experto en la técnica conoce la noción de sesgo en el uso de codones y como adaptar las secuencias nucleicas para un sesgo en el uso de codones particular sin modificar la proteína deducida.

El término "gen heterólogo" significa que el gen se deriva de una especie de microorganismo diferente del microorganismo receptor que lo expresa. Se refiere a un gen que no se da de forma natural en el microorganismo.

En la presente solicitud, todos los genes se referencian con sus nombres comunes y con referencias a sus secuencias de ácido nucleico y, si surge el caso, a sus secuencias de aminoácido. Usando las referencias dadas en el número de acceso para genes conocidos, los expertos en la técnica son capaces de determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levadura, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo rutinario se hace ventajosamente usando secuencias de consenso que pueden determinarse llevando a cabo alineamientos de secuencia con genes derivados de otros microorganismos y diseñando sondas degeneradas para clonar el gen correspondiente en otro organismo.

El experto en la técnica conoce medios diferentes para modular, y en particular sobre-regular o bajo-regular, la expresión de genes endógenos. Por ejemplo, una forma para mejorar la expresión de genes endógenos es introducir una o más copias suplementarias del gen en el cromosoma o un plásmido.

Otra forma es sustituir el promotor endógeno de un gen con un promotor más fuerte. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. Los promotores homólogos conocidos para permitir un alto nivel de expresión en levadura son los seleccionados en el siguiente grupo: ADH1, GPDH, TEF1, HXT7 truncado, PFK1, FBA1, PGK1, TDH3, etc. Los promotores particularmente interesantes en la presente invención se definen posteriormente más en detalle.

En la levadura, el constructo de expresión del ácido nucleico comprende preferiblemente secuencias reguladoras, tal como secuencias promotora y terminadora, que están unidas de forma operativa con la secuencia de ácido nucleico que codifica para cada uno de los genes considerados, y más particularmente para cada uno de las enzimas ALS, ALD, BDH y NOXE mencionadas anteriormente según la presente invención.

El constructo de expresión de ácido nucleico puede comprender además secuencias de reconocimiento de 5' y/o 3' y/o marcadores de selección.

El término "sobrexpresión" significa que la expresión de un gen o de una enzima se aumenta en comparación con el microorganismo no modificado. El aumento de la expresión de una enzima se obtiene aumentando la expresión de un gen que codifica dicha enzima. El aumento de la expresión de un gen puede realizarse mediante todas las técnicas conocidas por un experto en la técnica. A este respecto, puede citarse particularmente la implementación de un promotor fuerte corriente arriba del ácido nucleico previsto para sobreexpresarse o la introducción de varias copias de dicho ácido nucleico entre un promotor, especialmente un promotor fuerte, y un terminador.

La "actividad" de una enzima se usa de forma intercambiable con el término "función" y designa, en el contexto de la invención, la capacidad de una enzima para catalizar la reacción deseada.

Los términos "actividad reducida" o "actividad atenuada" de una enzima significan o una actividad catalítica específica reducida de la proteína obtenida por mutación en la secuencia de aminoácidos y/o concentraciones disminuidas de la proteína en la célula obtenida por mutación de la secuencia de ácido nucleico o por supresión del gen correspondiente similar.

El término "actividad mejorada" de una enzima designa o una actividad catalítica específica aumentada de la enzima, y/o una cantidad/disponibilidad aumentada de la enzima en la célula, obtenida por ejemplo por sobreexpresión del gen que codifica la enzima.

Los términos “que codifica” o “que cifra” se refiere al proceso por el que un polinucleótido, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, produce una secuencia de aminoácidos.

El (los) gen(es) que codifica(n) la(s) enzima(s) considerada(s) en la presente invención puede(n) ser exógeno(s) o endógeno(s).

5 “Atenuación” de genes significa que los genes se expresan en una tasa inferior que en el microorganismo no modificado. La atenuación puede conseguirse por medios y métodos conocidos por el experto en la técnica y contiene supresión génica mediante recombinación homóloga, atenuación génica mediante inserción de un elemento externo en el gen o expresión génica bajo un promotor débil. El experto en la técnica conoce una variedad de promotores que muestran diferentes fortalezas y que promotor usar para una expresión genética débil.

10 Los métodos implementados en la presente invención necesitan preferiblemente el uso de uno o más constructos de integración cromosómica para la introducción estable de una secuencia de nucleótidos heteróloga en una posición específica en un cromosoma o para la alteración funcional de uno o más genes diana en una célula microbiana modificada genéticamente. En algunas realizaciones, la alteración del gen diana evita la expresión de la proteína funcional relacionada. En algunas realizaciones, la alteración del gen diana da por resultado la expresión de una proteína no funcional a partir del gen alterado.

15 Los parámetros de constructos de integración cromosómica que pueden variarse en la práctica de la presente invención incluyen, aunque no están limitados a, las longitudes de las secuencias homólogas; la secuencia de nucleótidos de las secuencias homólogas; la longitud de la secuencia de integración; la secuencia de nucleótidos de la secuencia de integración; y la secuencia de nucleótidos del sitio diana. En algunas realizaciones, un intervalo efectivo para la longitud de cada secuencia homóloga es 20 a 5.000 pares de bases, preferentemente 50 a 100 pares de bases. En realizaciones particulares, la longitud de cada secuencia homóloga es aproximadamente 50 pares de bases. Para más información en la longitud de la homología necesaria para el direccionamiento génico, véase D. Burke et al., *Methods in yeast Genetics – A cold spring harbor laboratory course Manual* (2000).

20 En algunas realizaciones, el (los) gen(es) de piruvato descarboxilasa alterado(s) en que el (los) constructo(s) de ADN mencionado(s) anteriormente pretende(n) insertarse puede(n) comprender ventajosamente uno o más marcador(es) seleccionable(s) útil(es) para la selección de células microbianas transformadas. Preferiblemente, dichos marcadores seleccionables están comprendidos en el (los) constructo(s) de ADN según la presente descripción.

30 En algunas realizaciones, el marcador seleccionable es un marcador de resistencia al antibiótico. Ejemplos ilustrativos de marcadores de resistencia al antibiótico incluyen, aunque no están limitados a, los productos génicos NAT1, AUR1-C, HPH, DSDA, KAN<R> y SH BLE. El producto génico NAT1 de *S. noursei* confiere resistencia a la nourseotricina; el producto génico AUR1-C de *Saccharomyces cerevisiae* confiere resistencia a la Auerbasidina A (AbA); el producto génico HPH de *Klebsiella pneumonia* confiere resistencia a la Higromicina B; el producto génico DSDA de *E. coli* permite a las células cultivarse en placas con D-serina como la única fuente de nitrógeno; el gen KAN<R> del transposón Tn903 confiere resistencia a G418; y el producto génico SH BLE de *Streptoalloteichus hindustanus* confiere resistencia a la Zeocina (bleomicina).

35 En algunas realizaciones, el marcador de resistencia al antibiótico se elimina después de aislarse la célula microbiana modificada genéticamente de la invención. El experto en la técnica es capaz de elegir un marcador adecuado en el contexto genético específico.

40 En algunas realizaciones, el marcador seleccionable rescata una uxotrofia (p.ej., una auxotrofia nutricional) en la célula microbiana modificada genéticamente. En dichas realizaciones, una célula microbiana parental comprende una alteración funcional en uno o más productos génicos que funcionan en una ruta biosintética de aminoácidos o nucleótidos, tal como, por ejemplo, los productos génicos HIS3, LEU2, LYS1, LYS2, MET 15, TRP1, ADE2 y URA3 en la levadura, que vuelve a la célula microbiana parental incapaz de crecer en el medio sin suplementación con uno o más nutrientes (fenotipo auxotrófico). El fenotipo auxotrófico puede entonces rescatarse transformando a la célula microbiana parental con una integración cromosómica que codifica una copia funcional del producto génico alterado (NB: la copia funcional del gen puede originarse a partir de especies parecidas, tal como *Kluyveromyces*, *Candida*, etc.) y la célula microbiana modificada genéticamente generada puede seleccionarse en base a la pérdida del fenotipo auxotrófico de la célula microbiana parental.

50 Para cada una de las secuencias de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora, una secuencia de codificación (p.ej. una secuencia de codificación de una enzima), o una secuencia terminadora, se describen secuencias de referencia en la presente memoria. La presente descripción también incluye secuencias de ácido nucleico que tienen porcentajes específicos de identidad de ácido nucleico, con una secuencia de ácido nucleico de referencia.

55 Para cada una o las secuencias de aminoácidos de interés, se describen secuencias de referencia en la presente memoria. La presente descripción también incluye secuencias de aminoácidos (p.ej. secuencias de aminoácidos de

enzima), que tienen porcentajes específicos de identidad de aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos de referencia.

5 Por razones obvias, en toda la presente descripción, una secuencia de ácido nucleico específica o una secuencia de aminoácidos específica que cumple con, respectivamente, la identidad de nucleótidos o aminoácidos considerada, debería llevar además a la obtención de una proteína (o enzima) que presenta la actividad biológica deseada. Como se usa en la presente memoria, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácido nucleico o entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando ambas secuencias alineadas de forma óptima a través de una ventana de comparación.

10 La parte de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en la ventana de comparación puede por consiguiente incluir adiciones o supresiones (por ejemplo "huecos") en comparación con la secuencia de referencia (que no incluye estas adiciones o estas supresiones) para así obtener un alineamiento óptimo entre ambas secuencias.

15 El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones a las que una base nucleica idéntica, o un residuo de aminoácido idéntico, puede anotarse para ambas secuencias comparadas, dividiendo entonces el número de posiciones en que la identidad puede observarse entre ambas bases nucleicas, o entre ambos residuos de aminoácido, por el número total de posiciones en la ventana de comparación, después multiplicando el resultado por cien para obtener el porcentaje de identidad de nucleótidos entre la dos secuencias o el porcentaje de identidad de aminoácidos entre las dos secuencias.

La comparación del alineamiento óptimo de la secuencia puede efectuarse mediante un ordenador usando algoritmos conocidos.

20 Lo más preferiblemente, el porcentaje de identidad de secuencia se determina usando el software CLUSTAL W (versión 1.82) ajustándose los parámetros como sigue: (1) Modo CPU = ClustalW mp; (2) Alineamiento = "completo"; (3) formato de salida = "aln w/números"; (4) orden de salida = "alineado"; (5) alineamiento de color = "no"; (6) KTUP (tamaño de palabra) = "valor por defecto"; (7) longitud de la ventana = "valor por defecto"; (8) tipo de puntuación = "porcentaje"; (9) Topdiag = "valor por defecto"; (10) hueco de par = "valor por defecto"; (11) tipo de árbol filogenético/árbol = "ninguno"; (12) matriz = "valor por defecto"; (13) abertura de hueco = "valor por defecto"; (14) huecos finales = "valor por defecto"; (15) extensión del hueco = "valor por defecto"; (16) distancias del hueco = "valor por defecto"; (17) tipo de árbol = "cladograma" y (18) distancias del gráfico de árbol = "ocultar".

30 La "fermentación" o "cultivo" se realiza generalmente en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado al microorganismo que se cultiva, que contiene al menos una fuente simple de carbono, y si es necesario, co-sustratos.

35 Los microorganismos descritos en la presente memoria pueden cultivarse en medios de fermentación para la producción de un producto a partir de piruvato. Para la máxima producción de 2,3-BDO, las cepas de microorganismo usadas como huéspedes de producción tienen preferiblemente una alta tasa de utilización de carbohidrato. Estas características pueden conferirse por mutagénesis y selección, ingeniería genética, o pueden ser naturales. Los medios de fermentación, o "medio de cultivo" para las actuales células puede contener al menos aproximadamente 10 g/L de glucosa. Los sustratos de carbono adicionales pueden incluir aunque no están limitados a monosacáridos tales como fructosa, manosa, xilosa y arabinosa; oligosacáridos tales como lactosa, maltosa, galactosa o sacarosa; polisacáridos tales como almidón o celulosa; o mezclas de los mismos y mezclas no purificadas de materias primas renovables tales como permeado de suero de queso licor de maíz fermentado, melaza de remolacha azucarera y malta de cebada. Otros sustratos de carbono pueden incluir glicerol.

Por tanto, se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente descripción puede incluir una amplia variedad de sustratos que contienen carbono y solo se limitarán por la elección del organismo.

45 Aunque se contempla que todos los sustratos de carbono mencionados anteriormente y mezclas de los mismos son adecuados en la presente invención, los sustratos de carbono preferidos son glucosa, fructosa y sacarosa, o mezclas de estos con azúcares C5 tales como xilosa y/o arabinosa para microorganismos modificados para usar azúcares C5, y más particularmente glucosa.

Un sustrato de carbono preferido es sacarosa.

Según una realización particular, un sustrato de carbono descrito en la presente descripción no consiste en xilosa.

50 Además de una fuente de carbono apropiada, los medios de fermentación pueden contener minerales, sales, cofactores, tampones y otros componentes, adecuados, conocidos por los expertos en la técnica, adecuados para el crecimiento de los cultivos y promoción de la ruta enzimática necesaria para la producción del producto deseado.

Además, pueden considerarse modificaciones genéticas adicionales adecuadas para el crecimiento de microorganismos recombinantes según la invención.

La presencia de ácidos débiles se conoce por ser una limitación para el crecimiento y están a menudo presentes en medios derivados de celulosa o melaza.

5 Modificaciones genéticas adicionales tales como la alteración del gen JEN1 (o nombre sistemático: YKL217W o número de acceso de proteína P36035 (UniProtKB swiss-Prot)) y/o la sobreexpresión del gen HAA-1 (nombre sistemático: YPR008W o número de acceso Q12753 (UniProtKB swiss-Prot)) lleva a mejorar la resistencia de las cepas a los ácidos débiles en el medio de cultivo implementado.

Jen 1 es una proteína de membrana responsable de importar lactato a la célula (Casal M, et al. (1999), J. Bacteriol., 181(8):2620-3).

10 HAA-1 es un activador transcripcional que controla la expresión de las proteínas de estrés de membrana responsables de la resistencia a ácidos débiles. Su sobreexpresión mejora la resistencia de la levadura a ácidos acéticos (Tanaka et al. (2012) Appl Environ Microbiol., 78(22):8161-3).

La alteración del gen JEN1 y la sobreexpresión del gen HAA-1 pertenecen al conocimiento general de un experto en la técnica y pueden realizarse principalmente usando métodos presentados en la presente memoria.

15 En vista de la ecuación posterior de la presente memoria para la síntesis de 2,3-BDO en levadura, las condiciones a considerar en la presente invención son necesariamente condiciones aeróbicas.

El término "condiciones aeróbicas" se refiere a concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo que son suficientes para que un microorganismo aeróbico o anaeróbico facultativo use di-oxígeno como un aceptor electrónico terminal.

20 "Condición microaeróbica" se refiere a un medio de cultivo en que la concentración de oxígeno es menor que la del aire, es decir, concentración de oxígeno hasta 6% de O<sub>2</sub>.

Un "medio de cultivo apropiado" designa un medio (p.ej. un medio líquido estéril) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o crecimiento de la célula tales como fuentes de carbono o sustrato de carbono, fuentes de nitrógeno, por ejemplo, peptona, extractos de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y fosfato de amonio; fuentes de fósforo, por ejemplo, fosfato de monopotasio o fosfato de dipotasio; elementos traza (p.ej. sales metálicas), por ejemplo sales de magnesio, sales de cobalto y/o sales de manganeso; además de factores de crecimiento tales como aminoácidos, vitaminas, promotores del crecimiento y similares. El término "fuente de carbono" o "sustrato de carbono" o "fuente de carbono" según la presente invención indica cualquier fuente de carbono que puede usarse por los expertos en la técnica para soportar el crecimiento normal de un microorganismo, incluyendo hexosas (tal como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, oligosacáridos, disacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), melaza, almidón o sus derivados, celulosa, hemicelulosas y combinaciones de los mismos.

Levadura recombinante

Como se menciona anteriormente, la presente invención se refiere a una levadura recombinante que tiene una actividad reducida de piruvato descarboxilasa, en cuyo genoma se ha insertado:

- 35 - uno o más ácidos nucleicos que codifican una acetolactato sintasa o ALS,  
 - uno o más ácidos nucleicos que codifican una acetolactato descarboxilasa o ALD,  
 - uno o más ácidos nucleicos que codifican una butanodiol deshidrogenasa o BDH, y  
 - una o más copias de unos ácidos nucleicos que codifican una NADH oxidasa o NOXE,

40 Seleccionándose dichas una o más copias de unos ácidos nucleicos que codifican una NADH oxidasa o NOXE del grupo que consiste en secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos 78%, preferiblemente al menos 80%, de identidad de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:23 que presenta la actividad biológica deseada, y

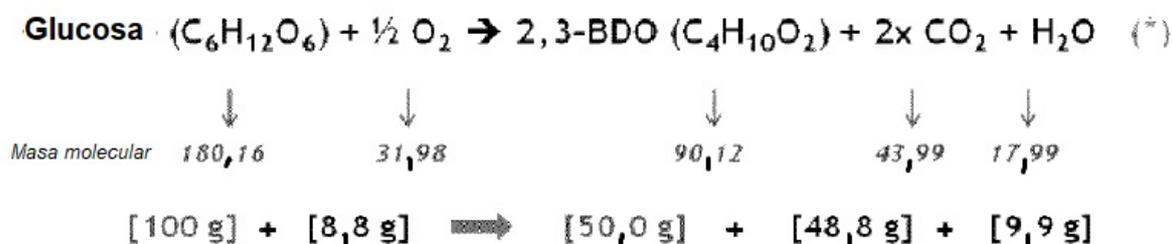
45 Dicha actividad de piruvato descarboxilasa se reduce mediante (i) la alteración de al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa insertando en dicho al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa al menos un constructo de ADN exógeno, (ii) mutaciones en regiones reguladoras, (iii) mutaciones en un codón de partida, principalmente sustituyendo AUG por GUG, (iv) mutaciones en secuencias de codificación que alteran la actividad enzimática (v) mutaciones, inserciones o supresión en la secuencia de codificación que alteran la estabilidad de la proteína y (vi) mutaciones que alteran la vida media de ARNm de piruvato descarboxilasa.

50 Como se muestra en los ejemplos de la presente memoria, los inventores encontraron inesperadamente que la presencia de un ácido nucleico que codifica una NADH oxidasa, ventajosamente la presencia de una pluralidad de copias del mismo, en una levadura recombinante en que la actividad de piruvato descarboxilasa se ha reducido y en

que se ha integrado adicionalmente genes que permiten la expresión de las enzimas ALS, ALD y BDH necesarias para la síntesis de 2,3-BDO, no solo contribuye a estabilizar dicha levadura recombinante sino que también permite una mejora significativa del crecimiento de esta cepa, además del rendimiento de la producción de 2,3-BDO.

5 El uso de organismos de levadura positivos en Crabtree tal como *saccharomyces cerevisiae*, y especialmente de organismos de levadura recombinante tal como *saccharomyces cerevisiae*, para producir metabolitos de interés es ventajoso ya que, en contraste con las bacterias, las células de levadura tienen la capacidad de realizar la fermentación en presencia de oxígeno en presencia de suficiente cantidad de azúcar tal como glucosa o sacarosa. En contraste, las bacterias realizan la fermentación solo en condiciones anaeróbicas. Además, los organismos de levadura no están sujetos a infección vírica en contraste con bacteriófago para bacterias. Aún más, el cultivo de 10 organismos de levadura raramente está sujetos a la contaminación por microorganismos no deseados tal como bacterias porque las células de levadura provocan la rápida acidificación de su entorno hasta pH 4, p.ej. el medio de cultivo que soporta su crecimiento. Aún más, las células de levadura no excretan un número de metabolitos indeseados tales como ácido láctico, cuya presencia en el medio de cultivo es un inconveniente actual para la posterior purificación de metabolito(s) de interés. Aún más, los organismos de levadura, que incluyen organismos de 15 levadura recombinante, tienen una mayor estabilidad genética en comparación con las bacterias.

La ecuación para la síntesis de 2,3-BDO en levadura es:



(\*) posible debido al hecho de que *S. cerevisiae* puede fermentar incluso en presencia de oxígeno.

20 En vista de la ecuación anterior, el rendimiento teórico máximo de 2,3-BDO sería 100 g para una entrada de 200 g de glucosa.

Como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, el rendimiento efectivo de 2,3-BDO con levadura recombinante según la presente invención es muy cercano a este rendimiento teórico máximo. Según el conocimiento del inventor, dicho rendimiento no se ha obtenido nunca hasta ahora.

25 Por consiguiente, la producción con un alto rendimiento de 2,3-BDO se alcanza con éxito en una levadura recombinante según la invención, preparando el camino para la producción industrial de 2,3-BDO usando levadura.

Sorprendentemente, como se muestra también en los ejemplos en la presente memoria, no se observa toxicidad del 2,3-BDO producido en las células de levadura, incluso a altas concentraciones de 2,3-BDO sintetizado. Lo que es más, el 2,3-BDO sintetizado se exporta totalmente fuera de las células, simplificando así sustancialmente el proceso de purificación.

30 La NADH oxidasa usada en la levadura recombinante según la presente invención es una enzima "dependiente de NADH" muy específica ya que no consume ningún aceptor carbonatado. Por esta razón, la NADH oxidasa seleccionada no interfiere directamente con el metabolismo carbonatado sino que rellena la reserva de NAD<sup>+</sup> en la producción de agua.

35 A este respecto, la NADH oxidasa usada en la levadura recombinante según la presente invención difiere principalmente de la enzima "dependiente de NADH" descrita en los documentos de la técnica anterior mencionados anteriormente, y especialmente en los documentos US 2011/0124060 y WO 2013/076144.

Según ciertas realizaciones, la levadura recombinante puede comprender uno o más constructo(s) de ADN seleccionado(s) en un grupo que comprende las siguientes fórmulas:

- (I) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-3' y 5'-[Gen 2]<sub>x2</sub>-3' y 5'-[Gen 3]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',
- 40 (II) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-[Gen 3]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',
- (III) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-3' y 5'-[Gen 3]<sub>x3</sub>-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',
- (IV) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-[Gen 3]<sub>x3</sub>-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3', y

Una combinación de las mismas,

En las que:

- "Gen 1" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE;
- "Gen 2" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferente del gen 1;
- 5 - "Gen 3" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferente de los genes 1 y 2;
- "Gen 4" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferente de los genes 1 a 3;
- "ALS" es un ácido nucleico que codifica una acetolactato sintasa;
- 10 - "ALD" es un ácido nucleico que codifica una acetolactato descarboxilasa;
- "BDH" es un ácido nucleico que codifica una butanodiol deshidrogenasa;
- "NOXE" es un ácido nucleico que codifica una NADH oxidasa;
- cada uno de "x1", "x2", "x3" y "x4", uno independientemente de los demás, representa un número entero que oscila de 0 a 50, preferiblemente de 0 a 20, y siempre que dicha levadura recombinante comprenda al menos un ácido nucleico que codifique para cada uno de ALS, ALD, BDH y NOXE.
- 15 Preferiblemente, cada uno entre "x1", "x2", "x3" y "x4", independientemente los unos de los otros, representa un número entero que oscila de 0 a 10, más particularmente que oscila de 0 a 5, en particular oscila de 0 a 3, y aún mejor representa un número entero igual a 1.
- Como se pretende en la presente memoria, cada uno de x1, x2, x3 y x4 puede tener un valor seleccionado en un grupo que comprende 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50.
- 20 En ciertas realizaciones en las que, en un constructo de ADN de fórmulas (I) a (IV) anteriores, uno o más de los números enteros "x1", "x2", "x3" y/o "x4", uno independientemente de los demás, tiene un valor de dos o más, entonces cada una o más de las dos o más copias del gen correspondiente entre Gen 1, Gen 2, Gen 3 y/o Gen 4 relacionado pueden ser idénticas o diferentes. Varias secuencias distintas de ALS, ALD, BDH y NOXE se representan en la Tabla 1 en la presente memoria.
- 25 En realizaciones ilustrativas de un constructo de ADN seleccionado de entre aquellos de fórmulas (I) a (IV) anteriores, en donde "x1" es un número entero igual a 2 y el Gen 1 es un ácido nucleico que codifica una acetolactato sintasa (ALS), entonces las dos secuencias de codificación de ALS contenidas en el constructo de ADN dicho pueden ser idénticas o diferentes.
- 30 Por ejemplo, según esta realización particular, significa que la primera copia del ácido nucleico que codifica una acetolactato sintasa puede ser el ácido nucleico que codifica ALS.Bs y la segunda copia del ácido nucleico que codifica una acetolactato sintasa puede ser el ácido nucleico que codifica ALS.Pp.
- En las realizaciones de una levadura recombinante según la presente descripción en las que la levadura recombinante dicha comprende al menos dos constructos de ADN seleccionados en el grupo que comprende los constructos de ADN de fórmulas (I) a (IV), cada constructo de ADN, y más particularmente cada uno de los genes entre Gen 1, Gen 2, Gen 3 y/o Gen 4 relacionados contenidos en él, pueden ser idénticos o diferentes.
- 35 En la presente memoria después se presentan algunas realizaciones ilustrativas de un constructo de ADN seleccionado en un grupo que comprende los constructos de ADN de fórmula (I), (II); (III) y (IV).
- 40 Levadura recombinante que comprende un constructo de ADN de fórmula (I):  
(I) 5'-[ALS]<sub>2</sub>-3' y 5'-[ALD]<sub>2</sub>-3' y 5'-[BDH]<sub>2</sub>-3' y 5'-[NOXE]<sub>3</sub>-3',
- Una levadura recombinante que comprende un constructo de ADN de fórmula (I) anterior tiene una actividad reducida de piruvato descarboxilasa, y posee los cuatro siguientes sub-constructos de ADN (i) y (iv) que se han introducido en el genoma del mismo:
- 45 (i) un sub-constructo de ADN que comprende dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos uno del (de los) otro(s), codificando cada ácido nucleico ALS, introduciéndose dicho sub-constructo de ADN en una primera posición en el genoma de dicha levadura recombinante;

(ii) un sub-constructo de ADN que comprende dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos uno del otro, codificando cada ácido nucleico ALD, introduciéndose dicho sub-constructo de ADN en una segunda posición en el genoma de dicha levadura recombinante, distinta de la posición en la que se han insertado los ácidos nucleicos que codifican ALS;

5 (iii) un sub-constructo de ADN que comprende dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos uno del otro, codificando cada ácido nucleico BDH, introduciéndose dicho sub-constructo de ADN en una tercera posición en el genoma de dicha levadura recombinante, distinta de la primera y segunda posiciones en las que se han insertado los ácidos nucleicos que codifican ALS y los ácidos nucleicos que codifican ALD; y

10 (iv) un sub-constructo de ADN que comprende tres ácidos nucleicos, idénticos o distintos el (los) uno(s) del (de los) otro(s), codificando cada ácido nucleico NOXE, introduciéndose dicho sub-constructo de ADN en una cuarta posición en el genoma de dicha levadura recombinante, distinta de la primera, segunda y tercera posiciones en las que se han insertado los ácidos nucleicos que codifican ALS y los ácidos nucleicos que codifican ALD y BDH, respectivamente.

15 En algunas realizaciones, la actividad reducida de piruvato descarboxilasa necesaria de la levadura recombinante específica dicha puede obtenerse mediante inserción en al menos uno de los genes *pdC* de la levadura de la menos un sub-constructo de ADN (i) a (iv), o de forma alternativa, una combinación de los mismos.

Levadura recombinante que comprende un constructo de ADN de fórmula (II):

(II) 5'-[ALS]<sub>1</sub>-[ALD]<sub>1</sub>-[BDH]<sub>1</sub>-3' y 5'-[NOXE]<sub>3</sub>-3'

20 La levadura recombinante resultante tiene una actividad reducida de piruvato descarboxilasa, y tiene un genoma en el que se ha insertado los dos siguientes sub-constructos de ADN (A) y (B), a saber:

(A) un primer sub-constructo de ADN 5'-[ALS]<sub>1</sub>-[ALD]<sub>1</sub>-[BDH]<sub>1</sub>-3' introduciéndose dicho primer sub-constructo de ADN en una primera posición en el genoma de dicha levadura recombinante, y comprendiendo dicho primer sub-constructo de ADN:

(i) un ácido nucleico que codifica ALS;

25 (ii) un ácido nucleico que codifica ALD; y

(iii) un ácido nucleico que codifica BDH;

30 (B) un segundo sub-constructo de ADN 5'-[NOXE]<sub>3</sub>-3', introduciéndose dicho sub-constructo de ADN en una segunda posición en el genoma de dicha levadura recombinante, distinta de la primera posición en la que el primer sub-constructo de ADN se ha insertado, y comprendiendo dicho segundo sub-constructo de ADN (iv) tres ácidos nucleicos, idénticos o distintos el (los) uno(s) del (de los) otro(s), codificando cada ácido nucleico NOXE.

En ciertas realizaciones, la actividad reducida de piruvato descarboxilasa de dicha levadura recombinante específica puede obtenerse mediante inserción en al menos uno de los genes *pdC* de levadura del primer sub-constructo de ADN.

Levadura recombinante que comprende dos constructos de ADN de fórmula (II):

35 (II-1) 5'-[ALS]<sub>1</sub>-[ALD]<sub>1</sub>-[BDH]<sub>1</sub>-3' y 5'-[NOXE]<sub>3</sub>-3', y

(II-2) 5'-[ALS]<sub>1</sub>-[ALD]<sub>1</sub>-[BDH]<sub>1</sub>-3' y 5'-[NOXE]<sub>0</sub>-3'.

La levadura recombinante resultante tiene una actividad reducida de piruvato descarboxilasa, y tiene un genoma en el que se ha insertado los tres siguientes sub-constructos de ADN (A), (B) y (C), a saber:

40 (A) un primer sub-constructo de ADN 5'-[ALS]<sub>1</sub>-[ALD]<sub>1</sub>-[BDH]<sub>1</sub>-3', introduciéndose dicho primer sub-constructo de ADN en una primera posición en el genoma de dicha levadura recombinante, y comprendiendo dicho primer sub-constructo de ADN;

(i) un ácido nucleico que codifica ALS;

(ii) un ácido nucleico que codifica ALD; y

(iii) un ácido nucleico que codifica BDH;

45 (B) un segundo sub-constructo de ADN 5'-[ALS]<sub>1</sub>-[ALD]<sub>1</sub>-[BDH]<sub>1</sub>-3', introduciéndose dicho segundo sub-constructo de ADN en una segunda posición en el genoma de dicha levadura recombinante, y comprendiendo dicho segundo sub-constructo de ADN;

- (i) un ácido nucleico que codifica ALS;
- (ii) un ácido nucleico que codifica ALD; y
- (iii) un ácido nucleico que codifica BDH;

y

- 5 (C) un tercer sub-constructo de ADN 5'-[NOXE]<sub>3</sub>-3', introduciéndose dicho sub-constructo de ADN en una tercera posición en el genoma de dicha levadura recombinante, distinta de la primera posición en la que se ha insertado el primer sub-constructo de ADN, y distinta de la segunda posición en la que se ha insertado el segundo sub-constructo de ADN y comprendiendo dicho tercer sub-constructo de ADN (iv) tres ácidos nucleicos, idénticos o distintos el (los) uno(s) del (de los) otro(s), codificando cada ácido nucleico NOXE.
- 10 En ciertas realizaciones, la actividad reducida de piruvato descarboxilasa necesaria de dicha levadura recombinante específica puede obtenerse por inserción en al menos uno de los genes *pdC* de levadura del primer sub-constructo de ADN y/o del segundo sub-constructo de ADN.

Levadura recombinante que comprende un constructo de ADN de fórmula (III):

(III) 5'-[ALS]<sub>2</sub>-[ALD]<sub>2</sub>-3' y 5'-[BDH]<sub>2</sub>-[NOXE]<sub>3</sub>-3',

- 15 Una levadura recombinante que comprende un constructo de ADN de fórmula (III) anterior tiene una actividad reducida de piruvato descarboxilasa, y posee un genoma en el que se han insertado los dos siguientes sub-constructos de ADN (A) y (B), a saber:

20 (A) Un primer sub-constructo de ADN 5'-[ALS]<sub>1</sub>-[ALD]<sub>4</sub>-3', introduciéndose dicho primer sub-constructo de ADN en una primera posición en el genoma de dicha levadura recombinante, y comprendiendo dicho primer sub-constructo de ADN;

(i) dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos uno del otro, codificando cada ácido nucleico ALS; y

(ii) dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos uno del otro, codificando cada ácido nucleico ALD;

25 (B) un segundo sub-constructo de ADN 5'-[BDH]<sub>3</sub>-[NOXE]<sub>3</sub>-3', introduciéndose dicho sub-constructo de ADN en una segunda posición en el genoma de dicha levadura recombinante, distinta de la primera posición en la que el primer sub-constructo de ADN se ha insertado, y comprendiendo dicho segundo sub-constructo de ADN:

(iii) dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos el uno del otro, codificando cada ácido nucleico BDH; y

(iv) tres ácidos nucleicos, idénticos o distintos el (los) uno(s) del (de los) otro(s), codificando cada ácido nucleico NOXE.

30 En ciertas realizaciones, la actividad reducida de piruvato descarboxilasa necesaria de dicha levadura recombinante específica puede obtenerse por inserción en al menos uno de los genes *pdC* de levadura del primer sub-constructo de ADN y/o del segundo sub-constructo de ADN.

Levadura recombinante que comprende un constructo de ADN de fórmula (IV):

(IV) 5'-[ALS]<sub>2</sub>-[ALD]<sub>2</sub>-[BDH]<sub>2</sub>-[NOXE]<sub>3</sub>-3',

35 Una levadura recombinante que comprende un constructo de ADN de fórmula (IV) anterior tiene una actividad reducida de piruvato descarboxilasa y posee un genoma en el que se ha insertado un constructo de ADN situado en una posición deseada en el genoma de dicha levadura recombinante, comprendiendo dicho constructo de ADN;

(i) dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos el uno del otro, codificando cada ácido nucleico ALS;

(ii) dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos el uno del otro, codificando cada ácido nucleico ALD;

(iii) dos ácidos nucleicos, idénticos o distintos el uno del otro, codificando cada ácido nucleico BDH; y

40 (iv) tres ácidos nucleicos, idénticos o distintos el (los) uno(s) del (de los) otro(s), codificando cada ácido nucleico NOXE.

En ciertas realizaciones, la actividad reducida de piruvato descarboxilasa necesaria de dicha levadura recombinante específica puede obtenerse por inserción de dicho constructo de ADN en al menos uno de los genes *pdC* de levadura.

Para cada una de estas cinco realizaciones ilustrativas anteriores de una levadura recombinante según la invención, y como se menciona anteriormente, cuando "x1" a "x4", una independientemente de las demás, representa(n) un número entero que tiene un valor de dos o más, entonces:

5 - una copia de ALS en un único constructo de ADN puede ser idéntica a otra copia de ALS comprendida en el constructo de ADN dicho o puede ser idéntica a todas las demás copias de ALS contenidas en el constructo de ADN dicho, o de forma alternativa la copia dicha de ALS puede ser distinta de cada una de las demás copias de ALS contenidas en el constructo de ADN dicho.

10 - una copia de ALD en un único constructo de ADN puede ser idéntica a otra copia de ALD comprendida en el constructo de ADN dicho o puede ser idéntica a todas las demás copias de ALD contenidas en el constructo de ADN dicho, o alternativamente la copia dicha de ALD puede ser distinta de cada una de las demás copias de ALD contenidas en el constructo de ADN dicho.

15 - una copia de BDH en un único constructo de ADN puede ser idéntica a otra copia de BDH comprendida en el constructo de ADN dicho o puede ser idéntica a todas las demás copias de BDH contenidas en el constructo de ADN dicho, o alternativamente la copia dicha de BDH puede ser distinta de cada una de las demás copias de BDH contenidas en el constructo de ADN dicho.

- una copia de NOXE en un único constructo de ADN puede ser idéntica a otra copia de NOXE comprendida en el constructo de ADN dicho o puede ser idéntica a todas las demás copias de NOXE contenidas en el constructo de ADN dicho, o alternativamente la copia dicha de NOXE puede ser distinta de cada una de las demás copias de NOXE contenidas en el constructo de ADN dicho.

20 Según ciertas realizaciones específicas, una levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos uno, preferiblemente al menos dos, constructo(s) de ADN de la fórmula (II) mencionada anteriormente, en la que "Gen 4" significa un ácido nucleico que codifica una NADH oxidasa (NOXE).

25 Según estas realizaciones específicas, cada ácido nucleico entre Gen 1, Gen 2 y Gen 3 significa necesariamente un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD y BDH. En estas realizaciones, al menos una copia de las ALS, ALD y BDH insertadas está presente. En las realizaciones en las que solo un constructo de fórmula (II) se inserta en el genoma de levadura, entonces cada ácido nucleico entre Gen 1, Gen 2 y Gen 3 significa necesariamente un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD y BDH y una copia de cada una de ALS, ALD y BDH está presente. En las realizaciones en las que un conjunto de dos o más constructos de fórmula (II) se insertan en el genoma de levadura, entonces cada ácido nucleico entre Gen 1, Gen 2 y Gen 3 significa necesariamente un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD y BDH y al menos una copia de cada una de ALS, ALD y BDH está presente en el conjunto dicho de dos o más constructos de ADN de fórmula (II).

35 Además, cuando la levadura recombinante dicha según la invención comprende al menos dos constructos de ADN de la fórmula (II) anterior, entonces dichos constructos de ADN de la fórmula (II) mencionada anteriormente pueden ser idénticos o diferentes.

Según otra realización, una levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos uno, preferiblemente al menos dos, constructo(s) de ADN de fórmula (IIa), idénticos o diferentes, en los que cada fórmula (IIa) tiene la siguiente fórmula:

40 (IIa) 5'-(prom5)<sub>y1</sub>-Gen 1-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-Gen 1-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-Gen 2-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-Gen 3-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-Gen 4-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x4</sub>-3'

En la que:

- Gen 1, Gen 2, Gen 3 y Gen 4, "x1", "x2", "x3" y "x4" son como se definen anteriormente;

- "x5" representa un número entero igual a 0 o 1;

- "y1", "y2", "z1" y "z2", uno independientemente de los otros, representan un número entero igual a 0 o 1;

45 - cuando dicha levadura recombinante comprende al menos dos constructo(s) de ADN de fórmula (IIa), entonces "x1" a "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" pueden ser idénticos o diferentes;

- "prom 1" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 1;

- "prom 2" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 2;

- "prom 3" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 3;

50 - "prom 4" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 4;

- "prom 5" es una secuencia reguladora que controla la expresión del Gen 1, siendo dicha prom5 idéntica o diferente de prom1;

- "term1" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 1;

5 - "term2" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 2;

- "term3" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 3;

10 - "term4" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 4; y

- "term5" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de Gen 1, siendo dicha term5 idéntica o diferente de term1.

Para una mejor claridad respecto a las características "x5" e "y1", se presenta después en la presente memoria ejemplos para ilustrar más en detalle las realizaciones particulares relacionadas:

15 • Cuando "x5" es un número entero igual a 1 e "y1" representa un número entero igual a 0, entonces significa que el Gen 1 considerado está bajo el control del promotor del gen de la levadura recombinante en que el constructo de ADN considerado se ha insertado; o

20 • cuando "x5" es un número entero igual a 1 e "y1" representa un número entero igual a 1, entonces significa que el Gen 1 considerado está bajo el control del promotor "prom5". A este respecto, la secuencia del promotor del gen endógeno, preferiblemente del gen *pdv*, en que el constructo de ADN está insertado se elimina, o al menos se interrumpe, además de la secuencia de su región de codificación relacionada.

Además, respecto a especialmente las características "y2" y "z2", se presenta después en la presente memoria ejemplos para ilustrar más en detalle realizaciones particulares relacionadas (por supuesto, en estos ejemplos después en la presente memoria, "x4" representa un número entero igual a 1 o más):

25 • cuando "y2" es un número entero igual a 0, entonces significa que el Gen 4 considerado está bajo el control del promotor del gen de la levadura recombinante en que el constructo de ADN considerado se ha insertado; o

• cuando "y2" es un número entero igual a 1, entonces significa que el Gen 4 considerado está bajo el control del promotor "prom4". A este respecto, la secuencia del promotor del gen endógeno en que el constructo de ADN está insertado se elimina, o al menos se interrumpe, además de la secuencia de su región de codificación relacionada.

30 • cuando "z2" es un número entero igual a 0, entonces significa que el Gen 4 considerado está unido al terminador de transcripción del gen de la levadura recombinante en que el constructo de ADN considerado se ha insertado; o

35 • cuando "z2" es un número entero igual a 1, entonces significa que el Gen 4 considerado está unido al terminador de transcripción "term4". A este respecto, la secuencia del terminador de transcripción del gen endógeno en que el constructo de ADN está insertado se elimina, o al menos se interrumpe, además de la secuencia de su región de codificación relacionada.

• respecto a "z1" cuando está presente en las fórmulas descritas en la presente memoria, lo mencionado anteriormente respecto a "z2" aplica a *mutatis mutandis*.

Según otra realización, una levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos uno, preferiblemente al menos dos, constructo(s) de ADN de la siguiente fórmula (IIb):

40 (IIb) 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-ALS-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-ALS-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-ALD-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-BDH-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-NOXE-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x4</sub>-3'

En la que:

- ALS, ALD, BDH, NOXE, "x1", "x2", "x3", "x4", "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" son como se definen anteriormente;

45 - cuando dicha levadura recombinante comprende al menos dos constructo(s) de ADN de fórmula (IIb), entonces "x1" a "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" pueden ser idénticos o diferentes;

- "prom 1" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa;

- "prom 2" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato descarboxilasa;
- "prom 3" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la butanodiol deshidrogenasa;
- 5 - "prom 4" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la NADH oxidasa;
- "prom 5" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa, siendo dicha prom5 idéntica o diferente de prom1;
- "term1" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa;
- 10 - "term2" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato descarboxilasa;
- "term3" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la butanodiol deshidrogenasa;
- 15 - "term4" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la NADH oxidasa; y
- "term5" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa, siendo dicha term5 idéntica o diferente de term1.

Según otra realización preferida, una levadura recombinante según la invención puede comprender al menos dos constructos de ADN de fórmula (II), (IIa) o (IIb), con tal que todas las copias del ácido nucleico de NOXE estén situadas en uno solo de al menos dos constructos de ADN de fórmula (II), (IIa) o (IIb).

Según otra realización, una levadura recombinante según la presente descripción puede comprender al menos dos, preferiblemente estrictamente dos, constructos de ADN de las siguientes fórmulas (IIc) y (IId):

- (IIc)  $5'-[(\text{prom}5)_{y1}\text{-ALS-term}5]_{x5}\text{-}[\text{prom}1\text{-ALS-term}1]_{x1}\text{-}[\text{prom}2\text{-ALD-term}2]_{x2}\text{-}[\text{prom}3\text{-BDH-(term}3)_{z1}]_{x3}\text{-}3'$  y  $5'-[(\text{prom}4)_{y2}\text{-NOXE-(term}4)_{z2}]_{x6}\text{-}3'$ ; y
- 25 (IId)  $5'-[(\text{prom}5)_{y1}\text{-ALS-term}5]_{x5}\text{-}[\text{prom}1\text{-ALS-term}1]_{x1}\text{-}[\text{prom}2\text{-ALD-term}2]_{x2}\text{-}[\text{prom}3\text{-BDH-(term}3)_{z1}]_{x3}\text{-}3'$  y  $5'-[(\text{prom}4)_{y2}\text{-NOXE-(term}4)_{z2}]_{x7}\text{-}3'$ ;

En las que:

- ALS, ALD, BDH, NOXE, "prom1", "prom2", "prom3", "prom4", "prom5", "term1", "term2", "term3", "term4" y "term5", "x1", "x2", "x3", "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" son como se definen anteriormente; y
- 30 - "x1" a "x3", "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" para cada una de las fórmulas (IIc) y (IId) que son idénticas o diferente; y
- "x6" y "x7" representan números enteros que oscilan de 0 a 50, preferiblemente de 0 a 20, preferiblemente de 0 a 12, más particularmente de 2 a 5, preferiblemente de 3 a 4, y mejor aún igual a 3, con tal que solo uno entre "x6" y "x7" representa 0.

Ventajosamente, el primer gen 1 en 5' en un constructo de ADN de fórmulas (I) a (IV), preferiblemente un gen representado por un ácido nucleico que codifica ALS, está bajo el control del promotor del gen de la levadura recombinante en que el constructo de ADN considerado se ha insertado.

Más particularmente, significa que, para un constructo de ADN de fórmula (IIa), (IIb), (IIc) o (IId), "x5" representa ventajosamente un número entero igual a 1 e "y1" representa un número entero igual a 0.

En vista de la complejidad de los constructos de ADN y sub-constructos de ADN mencionados anteriormente según la presente invención, se enfatiza que:

- respecto a un constructo de ADN de la invención, cuando "x1", "x2", "x3" y/o "x4" representa(n) un número entero mayor que o igual a 2, entonces:
  - cada copia para un ácido nucleico relacionado entre Gen 1, Gen 2, Gen 3 y/o Gen 4 puede ser idéntica o diferente; y/o
  - 45 ○ el promotor y/o terminador para cada copia para un ácido nucleico relacionado entre Gen 1, Gen 2, Gen 3 y/o Gen 4 puede ser idéntico o diferente;

- cuando una levadura recombinante comprende al menos dos constructos de ADN, dichos al menos dos constructos de ADN pueden ser idénticos o diferentes respecto a:

(i) su fórmula general en que un constructo de ADN puede caracterizarse mediante una fórmula seleccionada entre el grupo que comprende las fórmulas (I) a (IV);

5 (ii) el valor de “x1” a “x7”, “y1”, “y2”, “z1” y/o “z2”;

(iii) la naturaleza del promotor respecto al mismo gen;

(iv) la naturaleza del terminador respecto al mismo gen; y/o

(v) la naturaleza del mismo gen en sí mismo en que ALS, ALD, BDH y NOXE pueden derivar de organismos que pertenecen a diferentes géneros, como principalmente se representa posteriormente en la Tabla 1.

10 Los métodos implementados para realizar un constructo de ADN tal como se define anteriormente pertenecen al conocimiento general del hombre de la técnica.

A este respecto, el experto en la técnica puede referirse ventajosamente al método descrito en Shao et al. (Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, núm. 2: e16) y Shao et al. (Methods in Enzymology, 2012 Elsevier Inc., Vol. 517:203, finalmente con solo una variación menor, y se desarrolla más particularmente en los ejemplos posteriores en la presente memoria.

15

Actividad reducida de piruvato descarboxilasa

La actividad de piruvato descarboxilasa endógena en levadura convierte el piruvato a acetaldehído, que se convierte después a etanol o a aceti-CoA por medio de acetato.

20 Como se menciona anteriormente, la presente descripción describe una levadura recombinante que tiene actividad reducida de piruvato descarboxilasa, en cuyo genoma se ha insertado un constructo de ADN específico.

Como se describe en la presente memoria, la actividad de piruvato descarboxilasa de una levadura recombinante según la invención se reduce mediante (i) la alteración de al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa insertando en dicho al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa al menos un constructo de ADN exógeno, (ii) mutaciones en regiones reguladoras, (iii) mutaciones en un codón de inicio, principalmente sustituyendo AUG por GUG, y (iv) mutaciones en secuencias de codificación que alteran la actividad enzimática, (v) mutaciones, inserciones o supresión en la secuencia de codificación que alteran la estabilidad de la proteína y (vi) mutaciones que alteran la vida media del ARNm de piruvato descarboxilasa.

25

Respecto a la primera opción (i), el constructo de ADN implementado para alterar un gen *pdC* considerado puede ser un constructo de ADN exógeno diferente de los constructos de ADN según la invención como se describe anteriormente, un constructo de ADN según la invención, o una combinación de los mismos.

30

Además, como se menciona anteriormente, los constructos de ADN según la invención de fórmula (I), (II) y (III) están compuestos cada uno de dos o más sub-constructos de ADN.

Por lo tanto, según una variante particular de la realización, la actividad de piruvato descarboxilasa de una levadura recombinante según la presente descripción puede reducirse alterando al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa insertando en dicho gen solo al menos un sub-constructo de ADN de al menos un constructo de ADN según la invención de la fórmula (I), (II) y (III).

35

Preferiblemente, la actividad de piruvato descarboxilasa endógena puede reducirse por alteración de al menos un gen *pdC*.

De hecho, las levaduras pueden tener uno o más genes que codifican piruvato descarboxilasa. Por ejemplo, hay un gen que codifica piruvato descarboxilasa en *Kluyveromyces lactis*, mientras que hay tres isozimas de piruvato descarboxilasa codificadas por los genes *PDC1*, *PCD5* y *PDC6* en *Saccharomyces cerevisiae*, además de un gen regulador de piruvato descarboxilasa *PDC2*.

40

Preferiblemente, y como se define después en la presente memoria, una levadura recombinante según la presente descripción puede ser un género *Saccharomyces* recombinante, y preferiblemente una especie *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

45

Por consiguiente, la levadura recombinante pertenece preferiblemente al género *Saccharomyces*, y preferiblemente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

A este respecto, y según una primera variante, la actividad de piruvato descarboxilasa puede reducirse por alteración de al menos un gen *pdc*, preferiblemente de al menos dos genes *pdc*, y más particularmente de solo dos genes *pdc*.

5 Además, el (los) gen(es) *pdc* alterado(s) puede(n) seleccionarse del grupo que consiste en *pdc1*, *pdc5*, *pdc6* y una mezcla de los mismos, y preferiblemente de *pdc1* y *pdc6*.

Preferiblemente, cuando la levadura recombinante pertenece al género *Saccharomyces*, entonces la actividad de piruvato descarboxilasa puede reducirse por alteración de al menos dos genes *pdc*, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en *pdc1*, *pdc5*, *pdc6* y una combinación de los mismos, y más particularmente del grupo que consiste en *pdc1* y *pdc6*.

10 De hecho, la interrupción de los tres genes *pdc* en el género *Saccharomyces*, preferiblemente, la especie *Saccharomyces cerevisiae*, reduce dramáticamente el crecimiento de la cepa, volviéndola incompatible con cualquier aplicación industrial.

Según una variante particular, en el género *Saccharomyces*, preferiblemente la especie *Saccharomyces cerevisiae*, solo los genes *pdc1* y *pdc6* se alteran y la expresión de *pdc5* se atenúa.

15 El método implementado para atenuar la expresión de un gen específico pertenece al conocimiento general del hombre de la técnica.

A este respecto, el experto en la técnica puede hacer referencia de forma ventajosa a cualquier método que se conoce bien en la técnica.

20 Ventajosamente, para atenuar la expresión de *pdc5*, su transcripción puede ponerse bajo el control de un promotor débil, tal como principalmente RPLA1, URA3, MET25, HIS3, TRP1, GAP1, NUP57 o TFC1, y preferiblemente RPLA1 (= secuencia SEQ ID N°37).

Un método implementado para medir el nivel de actividad de una piruvato descarboxilasa pertenece al conocimiento general del hombre de la técnica.

25 A este respecto, el experto en la técnica puede hacer referencia ventajosamente al método descrito en Wang et al. (Biochemistry, 2001, 40:1755-1763).

#### Acetolactato sintasa

30 La enzima acetolactato sintasa (ALS) (también conocida como acetohidroxiácido sintasa (AHAS),  $\alpha$ -acetohidroxiácido sintetasa,  $\alpha$ -acetohidroxiácido sintasa,  $\alpha$ -acetolactato sintasa,  $\alpha$ -acetolactato sintetasa, acetohidroxiácido sintetasa, acetohidroxiácido sintasa, acetolactato piruvato-liasa (carboxilante), acetoláctico sintetasa) es una proteína que cataliza la primera etapa en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina).

ALS es una enzima implicada específicamente en la reacción química que implica la conversión de dos moléculas de piruvato a una molécula de acetolactato y dióxido de carbono. La reacción usa pirofosfato de tiamina para unir las dos moléculas de piruvato.

35 Un método implementado para medir el nivel de actividad de una acetolactato sintasa pertenece al conocimiento general del hombre de la técnica.

A este respecto, el experto en la técnica puede hacer referencia ventajosamente al método descrito en Poulsen et al. (Eur. J. Biochem. 185, 1989: 433-439).

La acetolactato sintasa preferida en la presente invención se conoce por el número EC 2.2.1.6.

40 Según una realización preferida, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una acetolactato sintasa o ALS puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) preferiblemente de un grupo que comprende *Bacillus subtilis*, *Nicotiana tabacum*, *Paenibacillus polymyxa*, y una mezcla de los mismos, y preferiblemente *Nicotiana tabacum* y *Paenibacillus polymyxa*.

45 Según una realización aún preferida, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una acetolactato sintasa puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 65%, preferiblemente al menos 80%, de identidad de ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO:1, 3 y 5.

50 Como se describe en la presente memoria, una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 65% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia incluye secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia dicha.

5 Como se describe en la presente memoria, una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia incluye secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia dicha.

10 Según otra realización particular, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una acetolactato sintasa puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 65%, preferiblemente al menos 80%, de identidad con secuencias SEQ ID NO:2, 5 y 6.

15 Como se describe en la presente memoria, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia dicha.

20 Como se describe en la presente memoria, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia dicha.

20 Como se menciona anteriormente, el nivel de expresión de ALS en la presente invención se regula mediante al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define después en la presente memoria más en detalle, que están presentes en la posición 5' y 3' respectivamente de la secuencia de ácido nucleico que codifica la ALS.

#### Acetolactato descarboxilasa

25 La enzima acetolactato descarboxilasa (ALD) (también conocida como  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa, (S)-2-hidroxi-2-metil-3-oxobutanoato carboxi-liasa, (S)-2-hidroxi-2-metil-3-oxobutanoato carboxi-liasa [(R)-2-acetoin-formadora] o (S)-2-hidroxi-2-metil-3-oxobutanoato carboxi-liasa [(3R)-3-hidroxi-2-ona-formadora]) pertenece a la familia de las liasas, específicamente las carboxi-liasas, que escinden los enlaces carbono-carbono y participa en el metabolismo del butanoato y el metabolismo del ácido dibásico c5-ramificado.

30 ALD es una enzima implicada específicamente en la reacción química que implica la conversión de una molécula  $\alpha$ -acetolactato a una molécula de acetoina y dióxido de carbono.

Un método implementado para medir el nivel de actividad de una acetolactato descarboxilasa pertenece al conocimiento general del hombre de la técnica.

A este respecto, el experto en la técnica puede hacer referencia ventajosamente al método descrito en Dulieu et al. (Enzyme and Microbial Technology 25, 1999: 537-542).

35 La acetolactato descarboxilasa preferida en la presente invención se conoce por el número EC 4.1.1.5.

Según una realización preferida, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una acetolactato descarboxilasa o ALD puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que comprende *Brevibacillus brevis*, *Enterobacter aerogenes*, *Lactococcus lactis* y una mezcla de los mismos, y preferiblemente *Brevibacillus brevis* y *Enterobacter aerogenes*.

40 Según una realización aún preferida, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una acetolactato descarboxilasa o ALD puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 36%, preferiblemente al menos 80%, de identidad del ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO: 7, 9 y 11.

45 Como se describe en la presente memoria, una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 36% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia incluye secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia dicha.

50 Según otra realización particular, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una acetolactato descarboxilasa puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 36%, preferiblemente al menos 80% de identidad con secuencias SEQ ID NO:8, 10 y 12.

- Como se describe en la presente memoria, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 36% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia dicha.
- Como se menciona anteriormente, el nivel de expresión de ALD en la presente invención está regulado por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define después en la presente memoria más en detalle, que están presentes respectivamente en la posición 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la ALD.
- 10 Butanodiol deshidrogenasa
- La enzima butanodiol deshidrogenasa (BDH) (también conocida como (R,R)-butanodiol deshidrogenasa, (R)-2,3-butanodiol deshidrogenasa, (R)-diacetil reductasa, 1-amino-2-propanol deshidrogenasa, 1-amino-2-propanol oxidorreductasa, 2,3-butanodiol deshidrogenasa, aminopropanol oxidorreductasa, butilenglicol deshidrogenasa, butilenglicol deshidrogenasa, D-(-)-butanodiol deshidrogenasa, D-1-amino-2-propanol deshidrogenasa, D-1-amino-2-propanol:NAD(2) oxidorreductasa, D-aminopropanol deshidrogenasa, D-butanodiol deshidrogenasa, diacetil (acetoin) reductasa) pertenece a la familia de oxidorreductasas, específicamente aquellas que actúan en el grupo CH-OH del dador con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptor.
- 15 BDH es una enzima implicada específicamente en la reacción química que implica la conversión de una molécula de acetoina usando NADH<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> a una molécula de butano-2,3-diol y NAD<sup>+</sup>.
- 20 Un método implementado para medir el nivel de actividad de una butanodiol deshidrogenasa pertenece al conocimiento general del hombre de la técnica.
- A este respecto, el experto en la técnica puede hacer referencia ventajosamente al protocolo descrito en Gao et al. (2012), Journal of basic microbiology 52, 1-9. En particular, la actividad de BDH se monitoriza después de la aparición de NADH a través de la absorbancia a 340 nm.
- 25 La butanodiol deshidrogenasa preferida en la presente invención se conoce por el número EC 1.1.1.4.
- Según una realización preferida, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una butanodiol deshidrogenasa o BDH puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que comprende *Enterobacter aerogenes*, *Paenibacillus polymyxa*, *Klebsiella oxytoca*, *Saccharomyces cerevisiae* y una mezcla de los mismos, y preferiblemente *Enterobacter aerogenes* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30 Más particularmente, cuando el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una butanodiol deshidrogenasa es un ácido nucleico seleccionado de *Saccharomyces cerevisiae*, significa que hay una sobreexpresión del ácido nucleico que codifica la butanodiol deshidrogenasa endógena.
- Según otra realización preferida, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una butanodiol deshidrogenasa puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 63%, preferiblemente al menos 80% de identidad con secuencias SEQ ID NO:13, 15, 17 y 19.
- 35 Como se describe en la presente memoria, una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 63% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia incluye secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia dicha.
- 40 Según otra realización particular, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una butanodiol deshidrogenasa puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 63%, preferiblemente al menos 80% de identidad de ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO:14, 16, 18 y 20.
- 45 Como se describe en la presente memoria, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 63% de identidad de aminoácidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia dicha.
- 50 Según una realización particular, cuando el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) la butanodiol deshidrogenasa es/son ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que comprende *Enterobacter aerogenes*, *Paenibacillus polymyxa*, *Klebsiella oxytoca* y una mezcla de los mismos, entonces el gen que codifica la butanodiol deshidrogenasa endógena se desconecta.

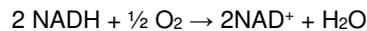
Como se menciona anteriormente, el nivel de expresión de BDH en la presente invención está regulado por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define después en la presente memoria en detalle, que están presentes respectivamente en la posición 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la BDH.

NADH oxidasa

5 La inactivación o reducción de actividad de al menos un gen *pdh* inactiva o reduce la ruta de fermentación de etanol en la levadura. En consecuencia, esto induce un estado redox desequilibrado que está solo parcialmente atenuado por la expresión de BDH. De hecho, la ruta de glucosa a 2 piruvato genera 2 equivalentes de NADH, mientras que la transformación de 2 piruvatos a butanodiol recicla solo 1 NADH en NAD<sup>+</sup> (véase la figura 1).

10 Los inventores encontraron que una enzima NADH oxidasa (también denominada en la presente descripción NOXE oxidasa o NOXE) formadora de agua bacteriana, en un nivel de expresión específico, puede no solo permitir equilibrar el estado redox que permite mejorar la estabilidad de esta cepa sino también permite mejorar el crecimiento de esta cepa y mejorar adicionalmente el rendimiento de 2,3-BDO.

Una NADH oxidasa formadora de agua bacteriana es una enzima que cataliza la siguiente reacción:



15 Las NADH oxidasas formadoras de agua preferidas en la presente invención se conocen por el número EC 1.6.3.1 y 1.6.99.3 (también conocida como NAD(P)H oxidasa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-formadora), oxidasa dual, NAD(P)H oxidasa, ThOX, THOX2, NADPH oxidasa tiroidea, tiroides oxidasa tiroides oxidasa 2 para EC 1.6.3.1 y NADH deshidrogenasa, dinucleótido Beta-NADH deshidrogenasa, citocromo c reductasa, diaforasa, dihidrocodeshidrogenasa I deshidrogenasa, dihidronicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa, difosfopirinasas, DPNH diaforasa, NADH diaforasa, NADH hidrogenasa, NADH oxidorreductasa, NADH-menadiona oxidorreductasa, NADH:citocromo c oxidorreductasa, nucleótido de difosfopiridina reducida diaforasa, deshidrogenasa tipo 1, deshidrogenasa tipo I para EC 1.6.99.3).

20 Una NADH oxidasa formadora de agua que puede considerarse en la presente invención se describe particularmente en el documento WO 2006/134277.

25 Un método implementado para medir el nivel de actividad de una NADH oxidasa según la invención pertenece al conocimiento general del hombre de la técnica.

A este respecto, el experto en la técnica puede hacer referencia ventajosamente al método descrito en López DE FELIPE et al. (International Daily Journal, 2001, vol. 11:37-44 (ISSN 0958-6946)).

30 Según una realización preferida, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una NADH oxidasa o NOXE puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que comprende *Streptococcus pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis* y una mezcla de los mismos, y preferiblemente *Streptococcus pneumoniae*.

35 Según otra realización, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una NADH oxidasa puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 78%, preferiblemente al menos 80% de identidad de ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO:21, 23, 25 y 27.

Como se describe en la presente memoria, una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 78% de identidad de nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico de referencia incluye secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de nucleótidos con la secuencia de ácido nucleico de referencia dicha.

40 Según otra realización particular, el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una NADH oxidasa puede(n) ser ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 78%, preferiblemente al menos 80% de identidad con secuencias SEQ ID NO:22, 24, 26 y 28.

45 Como se describe en la presente memoria, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 78% de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia que incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de referencia dicha.

50 Como se menciona anteriormente, el nivel de expresión de NADH oxidasa en la presente invención está regulado por al menos un promotor y al menos un terminador, tal como se define después en la presente memoria más en detalle, que están presentes respectivamente en la posición 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la NADH oxidasa.

Además, los efectos técnicos ventajosos mencionados anteriormente están unidos al nivel de expresión de dicha NADH oxidasa. De hecho, y como surge de los ejemplos posteriores en la presente memoria, no solo la mera presencia de una NADH oxidasa es importante sino que el nivel de la expresión de NADH oxidasa tiene también una extrema importancia en la producción de 2,3-BDO.

- 5 Como se menciona anteriormente, una levadura recombinante según la invención tiene una actividad reducida de piruvato descarboxilasa, y en cuyo genoma se ha insertado, principalmente, una o más copias de un ácido nucleico que codifica una NADH oxidasa o NOXE.

A este respecto, una levadura recombinante según la invención puede comprender principalmente de 1 a 20 copias de un ácido nucleico que codifica una NADH oxidasa.

- 10 Preferiblemente, una levadura recombinante según la invención puede comprender de 1 a 12, en particular de 2 a 5, preferiblemente de 3 a 4, y mejor aún igual a 3, copias de un ácido nucleico que codifica una NADH oxidasa.

Según una realización particular, el (los) constructo(s) de ADN de fórmulas (I) a (IV) que comprende(n) al menos el (los) gen(es) NOXE puede(n) insertarse en el gen URA3 endógeno de dicha levadura recombinante.

- 15 En vista de lo anterior, cada uno de los ácidos nucleicos que codifican acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa, butanodiol deshidrogenasa y NADH oxidasa está bajo el control de un promotor y de un terminador para así evitar la regulación indeseada, principalmente tal como se define después en la presente memoria.

Promotor

- 20 Por razones obvias, cada uno de los ácidos nucleicos que codifican la acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa, butanodiol deshidrogenasa y la NADH oxidasa está bajo el control de un promotor, idéntico o diferente.

Dichos promotores, idénticos o diferentes, que permiten la sobreexpresión constitutiva de un gen dado, pueden encontrarse en la bibliografía (Velculescu et al. (1997) Cell 88, 243-251).

Los promotores más particularmente interesantes en la presente invención pueden seleccionarse del grupo que comprende:

- 25
- pADH1 del gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa (gen ADH1 = Secuencia SEQ ID N°32),
  - pTDH3 del gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gen TDH3 = secuencia SEQ ID NO°39),
  - pTEF2.K1 del gen que codifica para el factor de alargamiento traduccional EF-1 alfa (gen TEF2 = secuencia SEQ ID N°30),
- 30
- pGPM1 del gen que codifica para la glicerato fosfomutasa (gen GPM1 = secuencia SEQ ID N°33),
  - pPDC1 del gen que codifica para la piruvato descarboxilasa (gen PDC1 = secuencia SEQ ID N°35),
  - pENO2 del gen que codifica para enolasa II (gen ENO2 = secuencia SEQ D NO°29),
  - pTEF3 del gen que codifica para la subunidad gamma del factor de alargamiento traduccional eEF1B (gen TEF3 = secuencia SEQ ID N°31),
- 35
- pFBA1 del gen que codifica para la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa II (gen FBA1 = secuencia SEQ ID N°34),
  - pPGK1 del gen que codifica para la 3-fosfoglicerato quinasa (gen PGK1 = secuencia SEQ ID N°36),
  - pPYK1 del gen que codifica para la piruvato quinasa (gen PYK1 = secuencia SEQ ID NO°49),
  - pTPI1 del gen que codifica para la triosa fosfato isomerasa (gen TPI1 = secuencia SEQ ID N°50), o
- 40
- pTEF1 del gen que codifica para el factor de alargamiento traduccional EF-1 alfa (gen TEF1 = secuencia SEQ ID N°38).

Además, también pueden usarse promotores homólogos de otras levaduras estrechamente relacionadas como promotores forman otra levadura forman el género *Saccharomyces*, o levadura de otro género tal como *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia* o *Kluyveromyces*.

- 45 Los promotores sintéticos como se describen en Blazeck y Alper (2013) Biotechnol. J. 8 46-58 también pueden usarse.

Más particularmente, dichos promotores, idénticos o diferentes, pueden caracterizarse preferiblemente por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 80% de identidad de ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO:29 a 39, 49 y 50.

Terminador

5 Por razones obvias, cada uno de los ácidos nucleicos que codifican acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa, butanodiol deshidrogenasa y NADH oxidasa está unido a un terminador de transcripción (que puede denominarse también "terminador" en la presente memoria), idéntico o diferente.

Dichos terminadores de transcripción, idénticos o diferentes, pueden encontrarse en la bibliografía de Yamanishi et al., (2013) ACS synthetic biology 2, 337-347.

10 Los terminadores más particularmente interesantes en la presente invención pueden seleccionarse del grupo que comprende:

- tTPI1 del gen que codifica para la triosa fosfato isomerasa (gen TPI1 = secuencia SEQ ID N°44),
- tMET25 del gen que codifica para la O-acetil homoserina-O-acetilserina sulfhidrilasa (gen Met25 = Secuencia SEQ ID N°45),
- 15 • tADH1 del gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa (gen ADH1 = secuencia SEQ ID N°43),
- tENO2 del gen que codifica para enolasa II (gen ENO2 = secuencia SEQ ID N°46),
- tTDH2 del gen que codifica para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, isozima 2 (gen TDH2 = secuencia SEQ ID N°40),
- tPGK1 del gen que codifica para la 3-fosfoglicerato quinasa (gen PGK1 = secuencia SEQ ID N°48),
- 20 • tCYC1 (= secuencia SEQ ID N°41),
- tMET3 (= secuencia SEQ ID N°47),
- tTDH3 (= secuencia SEQ ID N°42), y
- tDIT1 (= secuencia SEQ ID N°51).

25 Más particularmente, dicho terminador, idéntico o diferente, puede caracterizarse preferiblemente por una secuencia de ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 80% de identidad con las secuencias SEQ ID NO:40 a 48 y 51.

30 Según una realización particular, cada uno de los ácidos nucleicos que codifican acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa, butanodiol deshidrogenasa, y NADH oxidasa está bajo el control de un terminador de transcripción, idéntico o diferente, caracterizándose dichos terminadores de transcripción por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 80% de identidad de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:40 a 48.

Levadura recombinante

35 Generalmente, la levadura puede crecer rápidamente y puede cultivarse a mayor densidad en comparación con bacterias, y no necesita un medio aséptico en la configuración industrial. Además, las células de levadura pueden separarse más fácilmente del medio de cultivo en comparación con las células bacterianas, simplificando en gran medida el proceso para la extracción y purificación de producto.

40 Preferentemente, la levadura de la presente descripción puede seleccionarse entre el género *Saccharomyces*, *Candida Ashbya*, *Dekkera*, *Pichia (Hansenula)*, *Debaryomyces*, *Clavispora*, *Lodderomyces*, *Yarrowia*, *Zigosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspóra*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus* o *Malassezia*.

Más preferentemente, la levadura puede ser levadura Crabtree positiva de género de *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspóra*, *Zigosaccharomyces* o *Brettanomyces*.

45 Más preferentemente, la levadura puede ser de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces bayanus* o *Zigosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera bruceleensis*, *Dekkera intermedia*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces intermedius*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Torulaspóra globosa*, *Torulaspóra glabrata*.

- 5 Como se menciona anteriormente, una levadura recombinante según la presente descripción tiene una actividad piruvato descarboxilasa que se reduce mediante la inserción de al menos un(os) constructo(s) de ADN seleccionado(s) del grupo que comprende las fórmulas (I) a (IV), y preferiblemente de al menos uno de dicho(s) constructo(s) de ADN que comprende(n) solo al menos un(os) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) ALS, ALD y/o BDH.
- Según otra realización, la levadura recombinante puede ser una *Saccharomyces cerevisiae* recombinante y la actividad piruvato descarboxilasa se reduce por alteración de solo dos genes *pdc*.
- Más preferiblemente, el (los) gen(es) *pdc* alterado(s) puede(n) seleccionarse del grupo que consiste en *pdc1*, *pdc5*, *pdc6* y una mezcla de los mismos, y preferiblemente de *pdc1* y *pdc6*.
- 10 Los métodos implementados para insertar un constructo de ADN específico en un gen, y más particularmente un gen piruvato descarboxilasa, pertenecen al conocimiento general de un experto en la técnica. Un método relacionado se describe en más detalle en los ejemplos posteriores en la presente memoria.
- Realizaciones más preferidas
- 15 Ventajosamente, los ácidos nucleicos que codifican enzimas descritas en la presente descripción se eligen ventajosamente entre ALS.Bs, ALS.Pp, ALD.LI, ALD.Ea, BDH.Ea, BDH.Sc, NOXE.Spn, NOXE.L1 y una mezcla de los mismos.
- Según una realización preferida, una levadura recombinante según la presente descripción puede caracterizarse en que pertenece al género *Saccharomyces*, en particular la especie *Saccharomyces cerevisiae*, en donde la actividad de piruvato descarboxilasa endógena se reduce por alteración de al menos dos de los genes *pdc*, en particular por alteración de los genes *pdc1* y *pdc6*, en los que:
- 20 - uno de los genes *pdc*, preferiblemente el gen *pdc 1*, se altera por inserción de un constructo de ADN de la fórmula (Ile) posterior:
- 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-ALS.Bs-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-ALS.Bs-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-ALD.LI-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-BDH.Ea-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' (Ile), y
- 25 - el al menos otro gen *pdc*, distinto del gen *pdc* alterado mencionado anteriormente, y preferiblemente el gen *pdc 6*, se altera por inserción de un constructo de ADN de la fórmula (II<sup>f</sup>) posterior:
- 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-ALS.Pp-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-ALS.Pp-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-ALD.Ea-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-BDH.Sc-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' (II<sup>f</sup>),
- Y en el que el constructo de ADN de la siguiente fórmula (II<sup>f'</sup>):
- 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-NOXE.Spn-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x4</sub>-3' (II<sup>f'</sup>),
- Se inserta en el gen URA3,
- 30 En el que:
- prom1, prom2, prom3, prom4, prom5, term1, term2, term3, term4, term5, "y1", "y2", "z1" y "z2" son tal como se definen anteriormente y ALS.Bs, ALS.Pp, ALD.LI, ALD.Ea, BDH.Ea, BDH.Sc y NOXE.Spn, NOXE.L1 son tal como se define posteriormente en la Tabla 1,
- 35 - cada uno de "x1", "x2" y "x3", independientemente los unos de los otros, representa un número entero que oscila de 0 a 50, preferiblemente de 0 a 20, preferiblemente de 0 a 10, más particularmente de 0 a 3, y en particular igual a 1;
- "x4" representa un número entero que oscila de 0 a 50, preferiblemente de 0 a 20, preferiblemente de 0 a 12, más particularmente de 2 a 5, preferiblemente de 3 a 4, y mejor aún igual a 3,
- Con tal que dicha levadura recombinante comprenda al menos un ácido nucleico que codifique para cada ALS, ALD, BDH y NOXE, y más particularmente con tal que cada constructo de ADN de fórmula (Ile) y (II<sup>f</sup>) comprenda cada uno al menos un ácido nucleico que codifica para cada ALS, ALD y BDH.
- 40 En vista de lo anterior, y aunque se describe de forma implícita, se especifica que, entre cada una de las fórmulas (Ile) y (II<sup>f</sup>):
- "x1" a "x3", "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2", y/o
- el promotor y/o terminador para cada copia de ácido nucleico para un gen considerado,
- 45 Pueden ser idénticos o diferentes.

Según una realización preferida particular, una levadura recombinante según la presente descripción puede caracterizarse en que pertenece al género *Saccharomyces*, en particular la especie *Saccharomyces cerevisiae*, en la que la actividad piruvato descarboxilasa endógena se reduce por alteración de al menos dos de los genes *pdc*, en particular por alteración de los genes *pdc 1* y *pdc 6*, en los que:

- 5 - uno de los genes *pdc*, preferiblemente el gen *pdc 1*, se altera por inserción de un constructo de ADN de la fórmula (IIg) posterior:

5'-[ALS.Bs-tTDH2]<sub>1</sub>-[pENO2-ALD.LI-tCYC1]<sub>1</sub>-[pTEF3-BDH.Ea-tTDH3]<sub>1</sub>-3' (IIg),

- el al menos otro gen *pdc*, distinto del gen *pdc* alterado mencionado anteriormente, y preferiblemente el gen *pdc 6*, se altera por inserción de un constructo de ADN de la fórmula (IIh') posterior:

- 10 5'-[pADH1-ALS.Pp-tDPI1]<sub>1</sub>-[pTDH3-ALD.Ea-tMET25]<sub>1</sub>-[pGMP1-BDH.Sc-tENO2]<sub>1</sub>-3'

Y en el que el constructo de ADN de la siguiente fórmula (IIh''):

5'-[pENO2-NOXE.Spn-tPGK1]-3' (IIh'')

Se inserta en el gen *URA3*,

En el que:

- 15 - el gen "ALS.Bs" del constructo de ADN de fórmula (IIg) está bajo el control del promotor del gen *pdc* en que dicho constructo de ADN de fórmula (IIg) se inserta,

- *pENO2*, *pTEF3*, *pADH1*, *pTDH3*, *pGMP1*, *tTDH2*, *tCYC1*, *tTDH3*, *tDPI1*, *tMET25*, *tENO2* y *tPGK1* son como se definen en la presente descripción y más particularmente en el listado de secuencias posterior,

- 20 - ALS.Bs, ALS.Pp, ALD.LI, ALD.Ea, BDH.Ea, BDH.Sc y NOXE.Spn, NOXE.L1 son como se definen en la tabla 1 posterior y el modo particularmente en el listado de secuencias posterior.

Optimización de la producción de 2,3-butanodiol

Según una realización particular, la levadura recombinante según la presente descripción puede modificarse adicionalmente para optimizar la producción de 2,3-butanodiol.

Uso de fuentes alternativas de azúcar:

- 25 El uso directo de una fuente alternativa de azúcar tal como almidón necesita además la sobreexpresión en la levadura de la  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa exógenas (Buscke et al. Biosource technology 2013).

Importación de azúcar – Mejora de la importación de azúcar C5:

- 30 La importación de pentosas mediante el microorganismo recombinante es un grave problema para el proceso industrial ya que los azúcares C5 son constituyentes principales de la biomasa lignocelulósica hidrolizada. Las cepas nativas de *S. cerevisiae*, como muchos otros tipos de levadura, son incapaces de utilizar la xilosa o la arabinosa como sustratos de fermentación (Hahn-Hagerdal et al., 2007; Jin et al., 2004). De forma interesante, es capaz de absorber xilosa incluso aunque el azúcar no sea un sustrato natural (Hamacher et al., 2002).

- 35 GAL2, HXT1, HXT2, HXT4, HXT5 y HXT7 de *S. cerevisiae* catalizan la absorción de xilosa porque tienen una amplia especificidad de sustrato (Hamacher et al., 2002; Saloheimo et al., 2007; Sedlak y Ho 2004). Sin embargo, su afinidad por la xilosa es mucho menor que por la glucosa y la absorción de xilosa por los transportadores está fuertemente inhibida por la glucosa (Saloheimo et al., 2007).

Se necesitan varios cambios para obtener una cepa capaz de crecer y consumir xilosa y/o arabinosa. Estas diferentes modificaciones son una parte de la invención.

Sobreexpresión de transportadores de xilosa heterólogos:

- 40 Para mejorar la absorción de xilosa y arabinosa, la cepa productora de 2,3-BDO recombinante tiene que modificarse para expresar genes heterólogos que codifican para los transportadores de xilosa o arabinosa. Por ejemplo, los genes *GXF1*, *SUT1* y *AT5g59250* de *Candida intermedia*, *Pichia stipitis* y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente, se sobreexpresan para mejorar la utilización de xilosa por la levadura (Runquist et al., 2010).

Sobreexpresión de rutas implicadas en el metabolismo de xilosa y arabinosa:

- 45 Las cepas de levadura son capaces de absorber xilosa incluso aunque el azúcar no sea un sustrato natural. Incluso aunque los genes para la asimilación de xilosa estén presentes en *S. cerevisiae* no se expresan a un nivel suficiente

para permitir una asimilación de azúcar significativa. Por consiguiente, las modificaciones genéticas son necesarias para mejorar la asimilación de azúcares de pentosa. Todas las enzimas que permiten la transformación de xilosa o arabinosa a xilitol necesitan mejorarse además de las enzimas que convierten el xilitol en xilulosa, y la xilulosa en xilulosa-5-fosfato. Cualquiera de los dos, los genes homólogos de las rutas de xilosa y arabinosa tienen que sobreexpresarse o los genes heterólogos de las bacterias tienen que sobreexpresarse.

5 En una realización de la presente descripción, la absorción de xilosa y su asimilación por la cepa se mejoran sobreexpresando por ejemplo:

1) los genes XYL1 o GRE3 que codifican la aldolasa reductasa de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, respectivamente, asociados a la sobreexpresión de XYL2 que codifica la xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis*, combinado con la sobreexpresión de los genes XKS1 o XYL3 que codifican la xiluloquinasa de *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, respectivamente,

10

2) el gen *xylA* que codifica una xilosa isomerasa de bacterias o *Piromyces* asociado a la sobreexpresión de genes XKS1 o XYL3 que codifican la xiluloquinasa de *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, respectivamente.

En otra realización, la absorción de arabinosa y su asimilación por la cepa se mejoran sobreexpresando por ejemplo:

15 1) los genes homólogos XYL1 o GRE3 que codifican la aldolasa reductasa de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, respectivamente, asociados a *ladl* que codifica la L-arabinol 4-hidrogenasa e *lxrl* que codifica una L-xilulosa reductasa de *Trichoderma reesei*, en combinación con la sobreexpresión de XYL2 que codifica la xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis*, y además la sobreexpresión de los genes XKS1 o XYL3 que codifican la xiluloquinasa de *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, respectivamente,

20 2) genes heterólogos *araA* y *araB* que codifican la arabinosa isomerasa y ribulosa quinasa bacterianas.

Optimización de la ruta de la pentosa fosfato:

Esto puede hacerse sobreexpresando al menos un gen que pertenece a la ruta de pentosa fosfato no oxidativa; *TAL1*, *TKL1*, *RKL1* y *RPE1* de la cepa de levadura.

Optimización de la disponibilidad de cofactores NADPH necesarios para las enzimas implicadas en el metabolismo de los azúcares C5.

25

Esto se consigue expresando las transhidrogenasas de *E. coli* en la cepa de levadura. Los genes *udhA* y *pntAB* de *E. coli* se sobreexpresarán en la cepa productora.

Impedimento del consumo de glucosa hacia la síntesis de glicerol:

Esto puede hacerse alterando el gen *GPD1* que codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa EC 1.1.1.8 (GPDH).

30 La presente invención según esta realización es interesante particularmente en vista del rendimiento en 2,3-BDO a pesar del hecho de que la alteración del gen *GPD1* lleva a eliminar una actividad enzimática que consume NADH en favor de NAD. Para compensar el desequilibrio redox así generado, la cepa alterada en *GPD1* puede necesitar la expresión adicional de *NOXE*.

Según una realización particular, una cepa recombinante según la presente descripción es tal que no comprende ninguna modificación genética que tenga el efecto de reducir la represión de glucosa, como se describe en el documento WO 2011/041426 o Kim et al. (Bioresource Technology, vol. 146, 2013:274).

35

Según una realización particular, una cepa recombinante según la presente descripción es tal que no comprende ninguna modificación genética para permitir la expresión de cualquier ruta de asimilación de xilosa, como se describe en Kim et al. (Journal of Biotechnology, 2014).

40 Condiciones de cultivo

La presente invención también se refiere al uso de una levadura recombinante tal como se define anteriormente, para la producción de 2,3-butanodiol (BDO) y/o derivados directos del mismo, en particular seleccionándose dichos derivados directos de 2,3-butanodiol (BDO) del grupo que consiste en butano-dieno (BDE), metil-etil-cetona (MEK) o una mezcla de los mismos.

45 La presente descripción describe además un método de producción de 2,3-butanodiol (BDO) que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar un microorganismo recombinante como se describe anteriormente, cultivando el microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono, y

- recuperar el 2,3-butanodiol.

Típicamente, los microorganismos de la invención se cultivan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente a una temperatura que oscila de 27 a 34°C, en un medio de cultivo apropiado.

5 Cuando la levadura recombinante según la invención pertenece a la especie *S. cerevisiae*, la temperatura puede oscilar ventajosamente de 27 a 34°C, en un medio de cultivo apropiado.

10 Los medios de crecimiento adecuados para la levadura son medios comunes preparados comercialmente tales como caldo que incluye base de nitrógeno de levadura, sulfato de amonio, y dextrosa como la fuente de carbono/energía) o medio YPD, una mezcla de peptona, extracto de levadura, y dextrosa en proporciones óptimas para el máximo crecimiento. También puede usarse otros medios de crecimiento definidos o sintéticos y el medio apropiado para el crecimiento del microorganismo particular se conocerá por un experto en la técnica de la microbiología o ciencia de la fermentación.

El término "medio de cultivo apropiado" se define anteriormente.

15 Ejemplos de medios de cultivo conocidos para una levadura recombinante según la presente descripción se conocen por el experto en la técnica, y se presentan en la siguiente publicación D. Burke et al., *Methods in yeast Genetics – A cold spring harbor laboratory course Manual* (2000).

Los intervalos de pH adecuados para la fermentación pueden estar entre pH 3,0 a pH 7,5, donde pH 4,5 a pH 6,5 se prefiere como la condición inicial.

Las fermentaciones pueden realizarse bajo condiciones aeróbicas o condiciones micro-aeróbicas.

20 La cantidad de producto en el medio de fermentación puede determinarse usando un número de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de gases (GC).

25 El proceso presente puede emplear un método de fermentación en lotes. Una fermentación en lotes clásica es un sistema cerrado donde la composición del medio se ajusta al comienzo de la fermentación y no se somete a alteraciones artificiales durante la fermentación. Por consiguiente, al comienzo de la fermentación, el medio se inocula con el organismo u organismos deseados, y se permite que la fermentación se dé sin añadir nada al sistema. Típicamente, sin embargo, una fermentación "en lotes" es un lote con respecto a la adición de la fuente de carbono y se hacen a menudo intentos de controlar factores tales como temperatura, pH y concentración de oxígeno. En los sistemas en lotes, las composiciones de metabolito y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que la fermentación se para. En los cultivos en lotes las células progresan a través de una fase de latencia estática a una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente a una fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento se disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria morirán con el tiempo. Las células en fase logarítmica generalmente son responsables de la mayor parte de la producción de producto final o intermedio.

35 Un sistema por lotes con alimentación puede usarse también en la presente invención. Un sistema por lotes con alimentación es similar a un sistema por lotes típico con la excepción que el sustrato fuente de carbono se añade en incrementos según progresa la fermentación. Los sistemas por lotes con alimentación son útiles cuando la represión del catabolito (p.ej. represión de la glucosa) es apta para inhibir el metabolismo de las células y donde es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medida de la concentración de sustrato real en los sistemas por lotes con alimentación es difícil y por tanto se estima en base a los cambios de factores medibles tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de gases de desecho tal como CO<sub>2</sub>.

40 Las fermentaciones son comunes y bien conocidas en la técnica y pueden encontrarse ejemplos en Sunderland et al., (1992), incorporados en la presente memoria por referencia. Aunque la presente invención se realiza en modo de lotes se contempla que el método sería adaptable a la fermentación continua.

45 La fermentación continua es un sistema abierto donde un medio de fermentación definido se añade de forma continua a un biorreactor y una cantidad igual de medio acondicionado se elimina de forma simultánea para el procesado. La fermentación continua generalmente mantiene los cultivos a una alta densidad constante donde las células están principalmente en crecimiento en fase logarítmica.

50 La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan al crecimiento celular o concentración de producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o nivel de nitrógeno a una tasa fija y permitirá que todos los demás parámetros varíen. En otros sistemas un número de factores que afectan al crecimiento pueden alterarse de forma continua mientras que la concentración celular, medida por la turbidez del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos tratan de mantener las condiciones de crecimiento en estado estacionario y por consiguiente la pérdida celular debido al medio que se extrae debe equilibrarse frente a la tasa de crecimiento celular en la fermentación. Los métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para procesos de fermentación continua además de técnicas para maximizar la velocidad de formación de producto se conocen bien en la técnica de la microbiología industrial.

55

Se contempla que la presente invención pueda ponerse en práctica usando procesos en lotes, en lotes con alimentación o continuos, y que cualquier modo conocido de fermentación sería adecuado. Adicionalmente, se contempla que las células puedan inmovilizarse en un sustrato como catalizadores de células completas y someterse a condiciones de fermentación para la producción.

5 Purificación de 2,3-butanodiol

Según un aspecto específico de la invención, la producción fermentativa de 2,3-butanodiol comprende una etapa de aislamiento del 2,3-butanodiol del medio de cultivo. La recuperación del 2,3-butanodiol del medio de cultivo es una tarea rutinaria para un experto en la técnica. Puede conseguirse mediante un número de técnicas bien conocidas en la técnica que incluyen aunque no están limitadas a destilación, extracción por arrastre de gas, pervaporación o extracción líquida. El experto en el campo sabe cómo adaptar los parámetros de cada técnica dependiendo de las características del material a separar.

10

La levadura como modelo de microorganismo en la presente descripción se ha mantenido en que el 2,3-BDO sintetizado se exporta totalmente fuera de las células, simplificando el proceso de purificación.

15 El 2,3-BDO sintetizado puede recogerse por destilación. La destilación puede implicar un componente opcional diferente del medio de cultivo para facilitar el aislamiento de 2,3-butanodiol formando azeótropo y principalmente con agua. Este componente opcional es un disolvente orgánico tal como ciclohexano, pentano, butanol, benceno, tolueno, tricloroetileno, octano, dietiléter o una mezcla de los mismos.

La extracción por arrastre de gas se consigue con un gas de extracción por arrastre elegido entre helio, argón, dióxido de carbono, hidrógeno, nitrógeno o mezcla de los mismos.

20 La extracción líquida se consigue con disolvente orgánico como la fase hidrófoba tal como pentano, hexano, heptano, dodecano.

Las condiciones de purificación pueden adaptarse específicamente a la transformación corriente abajo de 2,3-BDO a metililecetona y/o 1,3-butadieno, que incluye mantener varios co-productos en el 2,3-BDO parcialmente purificado.

25 A lo largo de la descripción, incluyendo las reivindicaciones, la expresión “que comprende un” debería entenderse como que es sinónimo con “que comprende al menos uno”, a menos que se especifique otra cosa.

Además, la expresión “fórmulas (I) a (IV), según el contexto considerado y a menos que hay indicaciones contrarias, significa un constructo de ADN de fórmulas (I), (II), (III) y (IV) aunque también (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf), (IIg), (IIh) y/o (IIh’).”

30 Los términos “entre... y...” y “que oscila de... a...” deberían entenderse como que son inclusivos de los límites, a menos que se especifique otra cosa.

Los ejemplos y figuras que siguen se presentan por medio de ilustración y sin limitación implícita de la invención.

**Ejemplos**

a) Protocolo para fabricar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante según la invención

35 Todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes implementadas a continuación se construyeron a partir de la cepa estándar W303 (Thomas y Rothstein (1989), Cell. 56, 619-630) usando el procedimiento de genética molecular de levadura estándar (Methods in yeast Genetics – A cold spring harbor laboratory course Manual (2000) por D. Burke, D. Dawson, T. Stearns CSHL Press).

En estas cepas, la actividad de piruvato descarboxilasa se reduce por alteración de al menos uno de los genes *pdc* (*pdc1*, *pdc5*, *pdc6*) o por sustitución de su promotor de transcripción similar mediante un promotor débil.

40 En las cepas más eficientes, solo se suprimieron *pdc1* y *pdc6*.

45 Una variedad de enzimas exógenas se expresó en las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes consideradas. Se eligieron según sus parámetros enzimáticos de Michaelis Menten cuando estaban disponibles (véase la tabla 1 posterior en la presente memoria). Alta *k<sub>cat</sub>* para alta eficiencia, y variedad de *K<sub>m</sub>* para cubrir diferente concentración en el sustrato. Las enzimas *Paenibacillus polymyxa* se eligieron porque este organismo es un productor de 2,3-BDO natural.

La nomenclatura de los genes en relación con las enzimas exógenas implementadas acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa, butanodiol deshidrogenasa y NADH oxidasa formadora de agua se presenta en la Tabla 1 posterior.

Estos genes se designan por el acrónimo de la enzima seguido por el acrónimo del organismo de origen como sigue:

Tabla 1

Enzima	Gen	Organismo	Km (mM)	kcat (s <sup>-1</sup> )	Número de acceso
Acetolactato sintasa E.C.2.2.1.6 (ALS)	ALS.Bs	<i>Bacillus subtilis</i>	13	121	YP008831756.1
	ALS.Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>	11-16	3	P09114.1
	ALS.Pp	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	-	YP003869749.1
Acetolactato descarboxilasa E.C.4.4.4.5 (ALD)	ALD.Bb	<i>Brevibacillus brevis</i>	0,06	-	YP002775372.1
	ALD.Ea	<i>Enterobacter cloacae</i>	10-13	-	YP006476615.1
	ALD.LI	<i>Lactococcus lactis</i>	10	-	NP267263.1
Butanodiol deshidrogenasa E.C.1.1.1.4 (BDH)	BDH. Ea	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,4	-	YP004593688.1
	BDH.Pp	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0,5	-	WP016821825.1
	BDH.Ko	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	ACT82245.1
	BDH1.Sc	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	4,5	-	NP009341.2
NADH Oxidasa formadora de agua (NOX)	NOXE.LI	<i>Lactococcus lactis</i>			YP003352913.1
	NOXE.Spn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>			YP002742271.1
	NOXE.Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>			NP815302.1
	NOXE.Lb	<i>Lactobacillus brevis</i>			WP021742768.1

Además, para una mejor comprensión de los siguientes genotipos:

- ade2, his3, leu2, trp1 y ura3 son genes marcadores de auxotrofia.

5 - las letras minúsculas significan que el gen considerado está inactivo, las letras mayúsculas reflejan un gen activo.

- “::”: después de un nombre de gen significa que el gen se interrumpe por lo que sigue (si se inserta más de un gen, se anotan en corchetes []). La interrupción del gen es simultánea con una supresión completa de la secuencia de codificación pero conserva el promotor. En consecuencia el gen seguido por “::” está inactivo y se anota en minúsculas. Si no se especifica la transcripción del gen insertado se controla por el promotor del gen alterado.

10 - “gen.Kl” significa que el gen se origina a partir de *Kluyveromyces lactis*.

- Los promotores de transcripción que permiten la sobreexpresión constitutiva de un gen dado se encuentran en la bibliografía (Velculescu et al. (1997) Cell 88, 243-251). Los promotores usados en la presente memoria se designan por “p” seguidos por su nombre de gen parecido. Su respectivo número de secuencia también se menciona posteriormente.

15 - Los terminadores de transcripción se sitúan también después de cada gen. Para evitar la regulación indeseada los promotores y terminadores que enmarcan un gen insertado no se tomaron del mismo gen original. Los terminadores usados en la presente memoria se designan por “t” seguido por su nombre de gen parecido. Su respectivo número de secuencia también se menciona posteriormente.

20 Una agrupación de genes mencionados anteriormente se integró en la levadura recombinante de una vez usando la capacidad de la levadura de recombinar de forma eficiente los extremos de ADN libres que tienen la homología de secuencia.

La levadura recombinante se obtuvo según métodos publicados disponibles para el hombre de la técnica. En particular, puede seguirse el método descrito en Shao et al. (Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, núm. 2:e16) y Shao et al. (Methods in Enzymology, 2012 Elsevier Inc., Vol. 517:203), finalmente solo con una variación menor.

25 Más particularmente, las secuencias de codificación a clonar se sintetizaron de forma artificial. Para secuencias heterólogas (no levadura), las secuencias nucleicas se modificaron para obtener una secuencia de codificación sinónima usando el uso del codón de la levadura. Usando la enzima de restricción y tecnología de clonación clásica, cada secuencia sintética se clonó entre un promotor de transcripción y un terminador de transcripción. Cada secuencia promotora está precedida por una secuencia de 50 a 200 nucleótidos homóloga a la secuencia del terminador del gen corriente arriba. De forma similar, el terminador de cada gen (un gen que comprende el promotor-secuencia de codificación-terminador) está seguida por secuencias homólogas al gen que sigue inmediatamente. Así cada una de las unidades a integrar tiene una superposición de 50-200 nucleótidos tanto con la unidad corriente arriba como con la unidad corriente abajo. Para la primera unidad, el promotor está precedido por 50-200 nucleótidos homólogos al nucleótido de cromosoma de levadura para la posición en que se integrará. De forma similar, para la última unidad, el terminador está seguido por 50-200 nucleótidos homólogos al nucleótido del cromosoma de la levadura para la posición en que se integrará.

- Cada unidad se amplifica por PCR después a partir de constructos de plásmidos, dando la unidad X de ADN lineal que tiene secuencias superpuestas. Uno de estos genes es un marcador auxotrófico, para seleccionarse para el suceso de recombinación. Todos los fragmentos lineales se transforman en la levadura a la vez, y la levadura recombinante se selecciona para la auxotrofia relacionada con el marcador usado. La integridad de la secuencia se verifica entonces por PCR y secuenciación.
- 5 b) Respecto a las enzimas ALS y ALD
- Las enzimas ALS y ALD no se evaluaron individualmente, sino en pares (ALS + ALD) a través del rendimiento de acetoina. Tres ALD y ALS exógenas se eligieron según sus parámetros cinéticos: ALS.Nt, ALS.Pp, ALS.Bs y ALD.Bb, ALD.LI, ALD.Ea (véase anteriormente).
- 10 Ocho de las nueve posibles combinaciones de ALS y ALD se insertaron conjuntamente en el cromosoma de una cepa de levadura *ura3* detrás de los promotores y seguido por un terminador.
- La inserción de estos dos genes altera el gen *pdc1*. El gen marcador *URA3* se inserta simultáneamente para seleccionar el transformante. La combinación ALS/ALD se insertó en la cepa YA747, concretamente un derivado de W303 que tiene el siguiente genotipo:
- 15 YA747: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::HIS5.Sp*, *pdc6::LEU2.KI*, *trp1*, *ura3*.
- Las siguientes cepas se construyeron:
- YA768: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::[ALS.Bs-tTPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, URA3.KI]*, *pdc6::LEU2.KI*, *trp1*, *ura3*
- NB: en este caso, el gen "ALS.Bs" está bajo el control del promotor natural de *pdc1*, concretamente el promotor pPDC1.
- 20 YA769: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::[ALS.Nt-tTPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, URA3.KI]*, *pdc6::LEU2.KI*, *trp1*, *ura3*
- YA770: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::[ALS.Pp-tTPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, URA3.KI]*, *pdc6::LUE2.KI*, *trp1*, *ura3*
- 25 YA771: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::[ALS.Nt-tTPI1, pTDH3-ALD.Bb-tMET25, URA3.KI]*, *pdc6::LEU2.KI*, *trp1*, *ura3*
- YA772: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::[ALS.Nt-tTPI1, pTDH3-ALD.LI-tMET25, URA3.KI]*, *pdc6::LEU2.KI*, *trp1*, *ura3*
- 30 YA773: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::[ALS.Pp-tTPI1, pTDH3-ALD.LI-tMET25, URA3.KI]*, *pdc6::LEU2.KI*, *trp1*, *ura3*
- YA810: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::[ALS.Bs-tTPI1, pTDH3-ALD.Bb-tMET25, URA3.KI]*, *pdc6::LEU2.KI*, *trp1*, *ura3*
- YA811: MAT-a, *ade2*, *bdh1::TRP1.KI*, *his3*, *leu2*, *pdc1::[ALS.Pp-tTPI1, pTDH3-ALD.Bb-tMET25, URA3.KI]*, *pdce6::LEU2.KI*, *trp1*, *ura3*
- 35 Todas estas cepas se cultivaron durante 24 horas en 8% de glucosa YPA (Extracto de levadura al 1%, Bacto peptona al 2%, adenina 0,1 mM, glucosa al 8%). Se cosecharon y se determinó el contenido de acetoina, etanol y 2,3-BDO según métodos estándar con especificidad adaptada en Gonzales et al. (2010), Applied and environmental Microbiology 76 670-679.
- 40 Para algunas cepas, se ensayaron varios clones, el último número después de la "-" es el número de clon. Notar que como la enzima *bdh* endógena se altera, no se produce 2,3-BDO.
- La producción de etanol, acetoina y 2,3-BDO se monitorizan después de los métodos estándar y Gonzales et al. (2010), Applied and environmental Microbiology 76 670-679.
- Resultados
- La tabla 2 posterior presenta la producción de acetoina de las cepas probadas mencionadas anteriormente.
- 45

Tabla 2

Cepas	Etanol (g/l)	Acetoína (g/l)	2,3-BDO (g/l)	ALS	ALD
YA747-8	32,2	0,2	0,03		
YA772-6	31,4	0,6	0,02	Nt	LI
YA772-10	29,5	1,2	0,03	Nt	LI
YA773-3	31,8	0,2	0,02	Pp	LI
YA810-1	32,3	0,2	0,02	Bs	Bb
YA768-4	31,1	1,0	0,09	Bs	Ea
YA768-7	31,0	2,1	0,16	Bs	Ea
YA770-6	25,5	4,85	0,25	Pp	Ea
YA770-12	21,8	6,7	0,27	Pp	Ea
YA811-4	19,8	6	0,22	Pp	Bb
YA811-5	21,15	5,75	0,22	Pp	Bb
YA771-5	20,6	5,5	0,16	Nt	Bb
YA769-1	22,25	6,05	0,23	Nt	Ea
YA769-8	25,65	4,4	0,21	Nt	Ea

5 A partir de estos resultados, puede concluirse que, tomadas de forma separada, las mejores enzimas para mejorar la producción de acetoína son ALS Pp, ALS Nt, ALD Ea y ALD Bb que ciertamente parece que es la enzima más eficiente. La mayoría de las combinaciones de parejas de ALS y ALD se han ensayado en cepas que también sobreexpresan BDH. Estas cepas se clasificaron primero en su crecimiento en glucosa. Después dos de las cepas de crecimiento más rápido se ensayaron para la producción de butanodiol, concretamente:

10 YA538-5C: MAT-a, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-tTDH2, pENO2-ALD.LI-tCYC1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3, URA3.KI], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-Tdpi1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3

YA919-19: MAT-a, his3, leu2, pdc1::[ALD.Bb-tPGK1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3, pENO2-ALS.Nt-tCYC1, LEU2.KI], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-Tmet25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3

15 Ambos clones se cultivaron durante 48 horas en glucosa YPA al 16% en un matraz con deflectores de 250 ml bajo agitación vigorosa a 28°C. Las muestras se cosecharon a las 24 h, 32 h y 48 h. El contenido en etanol, acetoína y butanodiol en el lisato se ensayó, según los mismos protocolos como se referencia anteriormente.

Resultados

La tabla 3 posterior presenta estos contenidos de etanol, acetoína y 2,3-BDO en 16% de glucosa YPA.

Tabla 3

Cepa	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	Acetoína (g/l)	RR 2,3-BDO (g/l)	MESO 2,3-BDO (g/l)	RR + MESO (g/l)
YA538-5C	24	25,7	3,6	0,94	26,20	6,80	33,00
	32	37,7	5,2	1,59	35,23	11,52	46,75
	48	42,0	4,3	8,31	29,57	14,62	44,19
YA919-16	24	35,2	26,3	0,28	5,29	4,95	10,24
	32	43,8	42,4	0,15	5,53	6,38	11,92
	48	42,3	44,7	3,65	4,83	5,77	10,59

20 A partir de estos resultados, se concluye que la sobreexpresión de dos ALS y dos ALD aumenta significativamente la producción de 2,3-BDO (y por lo tanto de forma transitoria de acetoína) cuando se compara con solo un ALS y un ALD (véanse los resultados en la tabla 3 frente a la tabla 2).

25 La mejor combinación es ALS.Bs, ALS.Pp, ALD.Bb y ALD.Ea, aunque ALS.Bs y ALD.Bb no soportan una fuerte producción de acetoína por ellas mismas.

c) Determinación de las enzimas BDH más eficientes

Cuatro enzimas exógenas se sobreexpresaron usando el promotor pTEF1 en una cepa de levadura RR en que la enzima BDH1 endógena se ha inactivado. La actividad BDH presente en los diferentes lisatos celulares se ensayó y se compara con la actividad endógena.

La actividad BDH se monitoriza después de la aparición de NADH a través de la absorbancia a 340 nm, siguiendo el protocolo descrito en Gao et al. (2012) Journal of basic microbiology 52, 1-9.

Resultados

La tabla 4 posterior presenta la actividad BDH

5

Tabla 4

Cepa	Genotipo	Actividad (nmol/mg/min)
CC788-2B	BDH.Sc	276 ± 55
pAL06	bdh1::LEU2 + vector vacío (pRS 316)	No detectada
pAD320	bdh1::LEU2 + pRS316-pTEF1-BDH.Ea-tADH1	763 ± 41

Las enzimas de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y de *Enterobacter aerogenes* (Ea) parecen por consiguiente eficientes.

d) el efecto técnico ventajoso de la enzima NOXE en el rendimiento de 2,3-BDO

10 Tres copias de pENO2-NOXE.Spn-tPGK1 se insertaron en la cepa mencionada anteriormente YA538-5C, dando por consiguiente la cepa YA724-2. Las dos cepas se compararon por su respectiva producción de 2,3-BDO:

YA538-5C: MAT-a, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-tTDH2, pENO2-ALD.LI-tCYC1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3, URA3.KI], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3

15 YA724-2: MAT-a, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-tTDH2, pENO2-ALD.LI-tCYC1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3, LEU2.KI], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3::[pENO2-NOXE.Spn-URA3KI-tPGK1]x3

YA538-5C y YA724-2 se cultivaron en glucosa YPA 24%. Se tomaron alícuotas a lo largo del cultivo, y se ensayaron los contenidos de etanol, acetoína y BDO y glucosa en el cultivo según el procedimiento estándar.

20 El contenido de etanol, acetoína y butanodiol se ensayaron según los mismos protocolos como se referencia anteriormente.

El consumo de glucosa se monitoriza también después de métodos estándar y Gonzales et al. (2010), Applied and environmental Microbiology 76 670-679.

Resultados

25 Los resultados se presentan en las tablas 5a y 5b posteriores.

Tabla 5a

Cepa	Glucosa (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	Acetoína (g/l)	2,3-BDO (g/l)	Glucosa
YA538-5C	24%	4	1,8	0,0	0,3	0,4	250,4
		8	2,8	0,2	0,7	1,7	246,5
		24	21,5	0,5	0,9	33,6	156,0
		32	34,8	0,9	0,8	69,9	63,7
		48	44,2	0,8	5,1	90,6	ND*
		52	46,7	0,5	7,6	89,0	ND*

\* ND: No detectado.

Tabla 5b

Cepa	Glucosa (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	Acetoína (g/l)	2,3-BDO (g/l)	Glucosa
YA724-2	24%	8	9,7	0,4	1,6	3,4	230,0
		24	51,9	1,8	1,1	76,3	4,4
		28	54,1	2,5	0,7	<b>92,3</b>	1,0
		32	53,9	2,5	5,3	88,1	0,01
		48	54,9	1,0	10,7	83,5	ND*

\* ND: No detectado

Estos resultados muestran que la sobreexpresión de NOXE lleva a una acumulación más rápida de 2,3-BDO que sin NOXE. Un cultivo largo lleva a una oxidación de 2,3-BDO de vuelta a la acetoína.

Los genes NOXE de diferente origen donde se insertan en la cepa YA388-1C, que tiene el siguiente genotipo: MAT-a, his3, leu2, pdc1::HIS5.Sp, pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3

YA679-8, YA679-6 e YA679-4 contiene 1, 2 y 12 copias de pENO2-NOXE.LI-tPGK1 respectivamente.

YA680-2, YA680-3, YA724-2 y YA721-2D contiene 1, 2, 3 y 4 copias de pENO2-NOXE.Spn-tPGK1 respectivamente.

La actividad NOXE en lisato de levadura se determinó según López de Felipe y Hungenholtz (2001) International Diary Journal 11, 37-44.

10 Resultados

Los resultados se presentan en la tabla 6 posterior.

Tabla 6

Cepa	Genotipo	Actividad NOXE (nmol/mg/min)
YA388-1C	pdc1::HIS5.Sp, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc]	-
Y A583-1	pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-URA3.Sc], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Bb-NOXE.LI-BDH.Pp-TRP1. KI]	39 ± 7
YA679-8	pdc1::HIS5.Sp, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], ura3::[NOXE.LI-URA3]x1	183 ± 21
YA679-6	pdc1::HIS5.Sp, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], ura3::[NOXE.LI-URA3]x2	155 ± 32
YA679-4	pdc1::HIS5.Sp, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], ura3::[NOXE.LI-URA3]x12	1764 ± 226
YA719-2	pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3:: [NOXE.LI-URA3]x12	1835
YA680-2	pdc1::HIS5.Sp, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], ura3::[NOXE.Spn-URA3]x1	443 ± 52
YA680-3	pdc1::HIS5.Sp, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], ura3::[NOXE.Spn-URA3]x2	473 ± 55
YA724-2	pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Spn-URA3]x3	360 ± 33
YA721-2D	pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-URA3.Sc], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Spn-URA3]x4	937 ± 150

Todos los genes NOXE presentan una interesante actividad NOXE. Sin embargo, NOXE.Spn parece más activa que NOXE.LI.

15 Para optimizar la producción de 2,3-BDO, los genes NOXE de diverso origen y en diferentes números de copia se expresaron en YA538-5C.

Por consiguiente, se obtuvieron las siguientes cepas recombinantes.

YA719-2: MAT-a, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-tTDH2, pENO2-ALD.LI-tCYC1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3, LEU2.KI], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3::[pENO2-NOXE.LI-tPGK1-URA3]x12

20 YA721-2D: MAT-a, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-tTDH2, pENO2-ALD.LI-tCYC1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3, LEU2.KI], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3::[pENO2-NOXE.Spn-tPGK1-URA3]x4

YA724-2: MAT-a, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-tTDH2, pENO2-ALD.LI-tCYC1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3, LEU2.KI], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3::[pENO2-NOXE.Spn-tPGK1-URA3KI]x3

25

Estas cepas se cultivaron en 1,5 L de glucosa YPA al 30% en un fermentador de 3 L a 30°C bajo agitación (800 rpm) una oxigenación constante se mantuvo burbujeando 0,5 L/min-1 de aire. Se tomaron alícuotas a 24, 32, 48, 56 h, el contenido de etanol y 2,3-BDO y glucosa en el medio se determinó según métodos estándar y Gonzales et al. (2010), Applied and environmental Microbiology 76 670-679.

30

Resultados

Se presentan resultados en las tablas 7a, 7b y 7c posteriores.

Tabla 7a

Cepa	Glucosa (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	2,3 BDO (g/l)	Glucosa (g/l)
YA719-2	30%	24	59	0,0	4,0	245
		32	83	0,0	6,9	160
		48	96	0,0	28,8	15
		56	95	0,0	32,9	1,2

5

Tabla 7b

Cepa	Glucosa (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	2,3 BDO (g/l)	Glucosa (g/l)
YA721-2D	30%	24	80	6,5	79,4	130
		32	86	9,6	101,7	10
		48	96	8,6	106,7	0,025
		56	89	7,9	106,9	0,014

Tabla 7c

Cepa	Glucosa (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	2,3 BDO (g/l)	Glucosa (g/l)
YA724-2	30%	24	71	0,8	55,5	170
		28	90	0,9	75,0	105
		32	95	1,0	90,3	80
		48	86	1,1	125,9	23
		52	89	1,1	<b>135,5</b>	<b>14</b>

10 En conclusión, el nivel de la expresión NOXE tiene una importancia extrema en la producción de 2,3-BDO. YA724-2 que expresa menos NOXE que las dos otras cepas, alcanza un óptimo. La otra cepa que expresa mayores niveles de NOXE, no acumulan tanto 2,3-BDO. Hay que darse cuenta de que 135,5 g de 2,3-BDO representa el 90% del rendimiento teórico óptimo (150 g) cuando se parte de 300 g de glucosa.

e) Cepa recombinante prototrófica por inserción de gen HIS3

La cepa YA724-2 descrita anteriormente se volvió prototrófica por inserción del gen HIS3.

15 La cepa recombinante resultante se denomina YA1044, y tiene el siguiente genotipo:

YA1044-4: MAT-a, his3::HIS3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-tTDH2, pENO2-ALD.LI-tCYC1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3, LEU2.KI], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2.KI-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3::[pENO2-NOXE.Spn-tPGK1-URA3K1]x3

20 Esta cepa se ensayó entonces para la producción de 2,3-BDO en 30% de glucosa YPA bajo la misma condición que se describe anteriormente.

La producción de etanol, acetoína y 2,3-BDO y el consumo de glucosa se monitorizan siguiendo métodos estándar y Gonzales et al. (2010), Applied and environmental Microbiology 76 670-679.

Resultados

Los resultados se presentaron en la tabla 8 posterior.

25

Tabla 8

Cepa	Glucosa (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	Acetoína (g/l)	2,3 BDO (g/l)	Glucosa (g/l)
YA1044-4	30%	24	71,9	2,5	6,2	79,0	130
		32	85,9	2,5	0,8	116,8	80
		48	87,1	2,0	1,1	147,9	0,40
		52	87,3	1,3	5,3	143,2	0,02

## ES 2 776 361 T3

Esta cepa produce como mucho 147,9 g de 2,3-BDO (98% del rendimiento teórico partiendo de 300 g de glucosa).

Esta cepa también produce 2,3-BDO de forma eficiente en el 30% de sacarosa YPA (de otra forma las mismas condiciones que anteriormente).

Los resultados se presentan en la tabla 9 posterior.

5

Tabla 9

Cepa	Sacarosa (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	Acetoína (g/l)	2,3 BDO (g/l)	Glucosa (g/l)
YA1044-4	30%	24	142	1,6	14,7	78,6	10,0
		32	147	1,3	23,8	103,4	6,5
		48	153	1,1	19,0	149,0	0,06
		52	159	0,2	<b>19,8</b>	<b>149,4</b>	0,001

Esta cepa también produce 2,3-BDO de forma eficiente en un medio de maíz fermentado

### f) Atenuación del pdc5

Una levadura recombinante según YA1044-4 tal como se menciona anteriormente pero que difiere en que el gen pdc5 se atenúa más se ha preparado. La levadura recombinante resultante se denomina YA1245-1.

- 10 YA1245-1: pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc5::[HIS5.Sp, pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Spn-URA3]x3

Esta cepa se ensayó después para la producción de 2,3-BDO en 30% de glucosa CSL (licor de maíz fermentado) bajo la misma condición que se describe anteriormente.

- 15 La producción de etanol, acetoína y 2,3-BDO y consumo de glucosa se monitoriza siguiendo métodos estándar y Gonzales et al. (2010), Applied and environmental Microbiology 76 670-679.

### Resultados

Los resultados se presentan en la tabla 10 posterior.

Tabla 10

Cepa	Glucosa CSL (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	Acetoína (g/l)	2,3 BDO (g/l)	Glucosa (g/l)
YA1245-1	30%	24	82	6,0	5,4	65,6	130
		32	92	8,0	14,6	77,1	75
		48	100	7,2	20,2	103,3	15
		56	102	6,5	<b>19,7</b>	<b>109,6</b>	7

- 20 La cepa también produce 2,3-BDO de forma eficiente en 30% de glucosa YPA (de otra forma las mismas condiciones que anteriormente).

Los resultados se presentan en la tabla 11 posterior.

Tabla 11

Cepa	Glucosa YPA (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	Acetoína (g/l)	2,3 BDO (g/l)	Glucosa (g/l)
YA1245-1	30%	24	67	3,0	2,0	81,7	105
		32	116	3,8	7,1	127,3	13,0
		48	88	2,6	8,5	140,7	0,013
		56	85	2,2	9,8	<b>142,3</b>	0

### g) Modificaciones genéticas adicionales

- 25 Los ejemplos posteriores en la presente memoria parten de la levadura recombinante mencionada anteriormente YA1245-1, concretamente:

YA1245-1: MAT-a, his3, pdc1::[ALS.Bs-tTDH2, pENO2-ALD.LI-tCYC1, pTEF3-BDH.Ea-tTDH3-LEU2.KI], pdc5::[HIS5.Sp-RS-pRPLA1-PDC5], pdc6::[pADH1-ALS.Pp-tDPI1, pTDH3-ALD.Ea-tMET25, pTEF2kl-TRP1.Sc-tADH1, pGMP1-BDH.Sc-tENO2], trp1, ura3::[pENO2-NOXE.Sp-tPGK1, URA3]x3

## ES 2 776 361 T3

Esta cepa se cultivó en 1,5 L de sacarosa YPA al 35% en un fermentador de 3 L a 30°C bajo agitación (800 rpm) una oxigenación constante se mantuvo burbujeando 0,5 L/min-1 de aire. Se tomaron alícuotas a 24, 32 y 48 h, de contenido de etanol, acetoina y 2,3-BDO en el medio se determinó según métodos estándar y Gonzales et al. (2010), Applied and environmental Microbiology 76 670-679.

5 Los resultados se presentan en la tabla 12 posterior.

Tabla 12

Cepa	Sacarosa (%)	Tiempo (hora)	Densidad óptica	Etanol (g/l)	Acetoina (g/l)	2,3 BDO (g/l)
YA1245-1	35%	24	104	2,5	9,5	78,9
		32	117	3,7	6,1	123,5
		48	113	6,7	15,2	<b>170,1</b>

Este rendimiento en 2,3-BDO es el 96,6% del rendimiento máximo teórico.

Estos resultados confirman por consiguiente la capacidad de una cepa recombinante según la invención para crecer y también para producir de forma eficiente 2,3-BDO en sacarosa.

10 Dos cepas adicionales YA1898-3 e YA1950-1, derivadas de la cepa recombinante presentada anteriormente YA1245-1, se realizaron.

La cepa YA1898-3 difiere de la cepa YA1245-1 en que el gen LEU2.KI se ha escindido.

El gen LEU2.KI se refiere a las secuencias SEQ ID N° 55 y 56.

15 YA1898-3: Mat-a, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5-Sp-RS-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

La cepa YA1953-1 difiere de la cepa YA1245-1 en que los genes LEU2.KI e HIS5 se han escindido.

YA1953-1: Mat-a, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[RS-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.S-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

g)1) Mejora de resistencia a los ácidos débiles en el medio de cultivo

20 Se sabe que la presencia de ácidos débiles es una limitación para el crecimiento cuando las cepas se cultivan en medio derivado de celulosa o melaza. En las siguientes cepas, que se derivan de la cepa mencionada anteriormente YA1898-3 o YA1950-1, una o dos modificaciones se han insertado para intentar mejorar la resistencia de las cepas a los ácidos débiles en el medio. Las modificaciones consisten en la alteración del gen Jen1 o la sobreexpresión del gen HAA-1.

25 La secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos del gen HAA-1 están relacionadas con las secuencias SEQ ID N° 53 y 54 respectivamente.

En YA1950-1, jen1 se ha alterado por LEU2.KI.

YA1950-1: Mat-a, his3, jen1::LEU2.KI-RS, leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-RS-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

30 En las siguientes cepas YA1955-11, YA1997-2B e YA2036-1, HAA1 se sobreexpresa usando diferentes terminadores. A este respecto, el terminador tDIT1 se refiere a la secuencia SEQ ID N° 51.

YA1955-11: Mat-a, his3, leu2::[LEU2.KI-pTDH3-HAA1-tDIT1], pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

35 YA1997-2B: Mat- $\alpha$ , his3, leu2::[LEU2.KI-pTDH3-HAA1-tDIT1], pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

YA2036-1: Mat-a, his3, leu2::[LEU2.KI-pTDH3-HAA1-tDIT1], pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3.

En las siguientes cepas YA2007-2 e YA2008-13, HAA-1 se ha insertado en jlp1 (gen de sulfonato dioxigenasa) y SAM3 (gen de s-adenosil permeasa) respectivamente:

40 YA2007-2: Mat-a, his3, jlp1::[LEU2.KI-pTDH3-HAA1-tDIT1], leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

YA2008-13: Mat-a, his3, sam3::[LEU2.KI-pTDH3-HAA1-tDIT1], leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

En las siguientes cepas YA2188-2A, YA2208-1C e YA2208-3C, HAA1 se ha insertado en Jen1 que por lo tanto se inactiva:

5 YA2188-2A: Mat-a, his3, jen1::[LEU2.KI-pTDH3-HAA1-tTDH3], leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

YA2208-1C: Mat- $\alpha$ , his3, jen1::[LEU2.KI-pTDH3-HAA1-tTDH3], leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

g)2) Impedimento del consumo de glucosa hacia la síntesis de glicerol

10 En la siguiente cepa YA2153-1 e YA2153-11, derivada de la cepa anterior YA1898-3, el gen de glicerolfosfato deshidrogenasa gdp1 se ha inactivado por alteración para evitar el consumo de glucosa hacia la síntesis de glicerol:

YA2153-1: Mat-a, gdp1::LEU2.KI-RS, his3, leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

g)3) Alteración adicional de una pluralidad de genes

15 Las siguientes cepas tienen los mismos promotores y terminadores que la cepa definida anteriormente YA-1245 excepto que se mencione otra cosa. Una pluralidad de los genes se ha alterado usando LoxP, que es un corto que tiene la secuencia SEQ ID N°52.

20 DA385: MAT-a/MAT- $\alpha$ , his3/his3, leu2/leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI]/pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc5::[HIS5.Sp-RS-pRPLA1-PDC5]/pdc5::HIS5.Sp, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc]/pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1/trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3/ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

DA411: MAT-a/MAT- $\alpha$ , ade2/ade2, his3/his3, leu2/leu2, pdc1::loxP/pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc5::loxP/pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5], pdc6::loxP/pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1/trp1, ura3/ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

25 DA426: MAT-a/MAT- $\alpha$ , ADE2/ade2, his3/his3, leu2/leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI]/pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5]/pdc5::URA3.KI, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc]/pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1/trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3/ura3

30 DA510: MAT-a/MAT- $\alpha$ , his3/his3, JEN1/jen1::[LEU2.KI-RS-pTDH3-HAA1-tTDH3], leu2/leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea]/pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea], pdc5::[HIS5.Sp-pRPLA1-PDC5]/pdc5::[HIS5.Sp-RS-pRPLA1-PDC5], pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc]/pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1/trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3/ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

DA511: MAT-a/MAT- $\alpha$ , his3/his3, JEN1/jen1::[LEU2.KI-RS-pTDH3-HAA1-tTDH3], leu2/leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea]/pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc5::[HIS5.Sp-RS-pRPLA1-PDC5]/pdc5::HIS5.Sp, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc]/pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1/trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3/ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

35 DA512: MAT-a/MAT- $\alpha$ , his3/his3, JEN1/jen1::[LEU2.KI-RS-pTDH3-HAA1-tTDH3], leu2/leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea]/pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc5::[HIS5.Sp-RS-pRPLA1-PDC5]/pdc5::URA3.KI, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc]/pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1/trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3/ura3

40 DA540: MAT-a/MAT- $\alpha$ , his3/his3, jen1::[LEU2.KI-RS-pTDH3-HAA1-tTDH3]/jen1::[LEU2.KI-RS-pTDH3-HAA1-tTDH3], leu2/leu2, pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea]/pdc1::[ALS.Bs-ALD.LI-BDH.Ea-LEU2.KI], pdc5::[HIS5.Sp-RS-pRPLA1-PDC5]/pdc5::URA3.KI, pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc]/pdc6::[ALS.Pp-ALD.Ea-TRP1.Sc-BDH.Sc], trp1/trp1, ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3/ura3::[NOXE.Sp-URA3]x3

Conclusión

45 Todas las cepas descritas en el punto actual g) se han probado para la producción de 2,3 BDO; producen la cantidad equivalente que la cepa recombinante mencionada anteriormente YA1245.

Algunas de las cepas mencionadas anteriormente presentaron además efectos técnicos ventajosos en que llevan a una reducción de la síntesis de glicerol o una resistencia mejorada a los ácidos débiles en el medio de cultivo.

# ES 2 776 361 T3

Listado de secuencias

<110> Alderys

<120> Cepas de microorganismo para la producción de 2,3-butanodiol

<150> EPEP14306202.4

5 <151> 25-07-2014

<160> 56

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1716

10 <212> ADN

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> fuente

<222> 1...1716

15 <223> /tipo\_mol= "ADN"

/organismo= "Bacillus subtilis"

<400> 1

```

atgtctacca aagcaacaaa agagcaaaag agccttgtga agaatagagg tgcagaactt      60
gtcgttgatt gcttggtaga acagggagtc actcacgttt tcgggatacc cggcgctaaa     120
atcgacgccg tgtttgacgc ttacaggat aagggaccag agatcattgt tgctagacat     180
gaacagaatg cagcgttcat ggctcaagct gtaggtagac ttactgggaa acccggtgtg     240
gttttggtta ctagtggacc aggtgcatca aatctagcaa caggtttgtt aacagcgaat     300
acagagggag atcctgttgt tgcattagca ggaaacgtta tcagagcggg tagactgaaa     360
agaaccatc aatcattgga taatgctgca ttatttcagc caattacgaa atattccgtc     420
gaagtacagg atgtgaagaa catacctgaa gctgtaacta atgcgtttcg tatagcttct     480
gctgtgcaag ctggtgcagc ttttgtttcg tttccgcaag acgttgtcaa cgaggttacg     540
aacactaaga atgtgagagc agtagcagcc caaaattag gaccagctgc tgatgatgct     600
atatcagctg ctattgctaa gattcagaca gccaaactac ctgttgtcct agtaggtatg     660
aaagtgggca ggcagaagc aatcaaggca gttagaaaac tgttgaagaa ggttcaattg     720
ccgtttgtgg aaacctatca agccgcaggg actttgtcta gggatctaga agatcaatac     780
ttcggtagaa tagggttgtt cagaaatcaa cctggcgact tgttactgga acaagccgat     840
gtcgtgctta caattgggta cgatccgatt gaatatgacc ccaaattttg gaatattaat     900
ggatgatagga ctattatcca cttagacgag attattgccg atattgacca tgcttatcaa     960
cctgatctgg aactgatagg tgatattcca agtactatca accatataga gcatgatgcc    1020
gtcaaagtgg aatttgccga aagagaacag aagatcctat ccgatctaaa gcagtacatg    1080
catgaaggcg aacaagttcc agcagattgg aaatccgata gagcacatcc attggaaatt    1140

```

ES 2 776 361 T3

gtcaaagaat tgagaaatgc agttgatgac catgttacag ttacttgtga cataggtagt 1200  
cacgctatatt ggatgtctag gtacttcaga tcttatgagc cattaacggt gatgatatcc 1260  
aatggcatgc aaacccttgg agtcgcttta ccatgggcca ttggtgcgtc gttagtaaag 1320  
ccaggagaga aagtcgtttc tgtgtcaggt gatgggtggtt tcttgttctc tgccatggaa 1380  
ttggaaaccg ccgttcgttt gaaagcccct atagtacaca tcgtgtggaa tgattcgacc 1440  
tatgacatgg tcgcgtttca acaattgaag aagtacaacc gtacttcagc tgttgatttc 1500  
ggcaacattg acattgtgaa gtacgcggaa agctttggcg ccacaggcct aagagtcgaa 1560  
tcacctgac aattagcaga tgtacttagg caagggatga acgctgaagg acctgtaatt 1620  
atcgacgtac ctgttgacta tagcgacaac atcaatttag ccagtgataa attacccaaa 1680  
gagtttggtg agctaataa aacgaaagct ttgtaa 1716

<210> 2

<211> 571

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<220>

<221> fuente

<222> 1...571

<223> /tipo\_mol= "proteína"

10 /organismo: "Bacillus subtilis"

<400> 2

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

ES 2 776 361 T3

Pro Phe Val Glu Thr Tyr Gln Ala Ala Gly Thr Leu Ser Arg Asp Leu  
 245 250 255  
 Glu Asp Gln Tyr Phe Gly Arg Ile Gly Leu Phe Arg Asn Gln Pro Gly  
 260 265 270  
 Asp Leu Leu Leu Glu Gln Ala Asp Val Val Leu Thr Ile Gly Tyr Asp  
 275 280 285  
 Pro Ile Glu Tyr Asp Pro Lys Phe Trp Asn Ile Asn Gly Asp Arg Thr  
 290 295 300  
 Ile Ile His Leu Asp Glu Ile Ile Ala Asp Ile Asp His Ala Tyr Gln  
 305 310 315 320  
 Pro Asp Leu Glu Leu Ile Gly Asp Ile Pro Ser Thr Ile Asn His Ile  
 325 330 335  
 Glu His Asp Ala Val Lys Val Glu Phe Ala Glu Arg Glu Gln Lys Ile  
 340 345 350  
 Leu Ser Asp Leu Lys Gln Tyr Met His Glu Gly Glu Gln Val Pro Ala  
 355 360 365  
 Asp Trp Lys Ser Asp Arg Ala His Pro Leu Glu Ile Val Lys Glu Leu  
 370 375 380  
 Arg Asn Ala Val Asp Asp His Val Thr Val Thr Cys Asp Ile Gly Ser  
 385 390 395 400  
 His Ala Ile Trp Met Ser Arg Tyr Phe Arg Ser Tyr Glu Pro Leu Thr  
 405 410 415  
 Leu Met Ile Ser Asn Gly Met Gln Thr Leu Gly Val Ala Leu Pro Trp  
 420 425 430  
 Ala Ile Gly Ala Ser Leu Val Lys Pro Gly Glu Lys Val Val Ser Val  
 435 440 445  
 Ser Gly Asp Gly Gly Phe Leu Phe Ser Ala Met Glu Leu Glu Thr Ala  
 450 455 460  
 Val Arg Leu Lys Ala Pro Ile Val His Ile Val Trp Asn Asp Ser Thr  
 465 470 475 480  
 Tyr Asp Met Val Ala Phe Gln Gln Leu Lys Lys Tyr Asn Arg Thr Ser  
 485 490 495  
 Ala Val Asp Phe Gly Asn Ile Asp Ile Val Lys Tyr Ala Glu Ser Phe  
 500 505 510  
 Gly Ala Thr Gly Leu Arg Val Glu Ser Pro Asp Gln Leu Ala Asp Val  
 515 520 525  
 Leu Arg Gln Gly Met Asn Ala Glu Gly Pro Val Ile Ile Asp Val Pro  
 530 535 540  
 Val Asp Tyr Ser Asp Asn Ile Asn Leu Ala Ser Asp Lys Leu Pro Lys  
 545 550 555 560  
 Glu Phe Gly Glu Leu Met Lys Thr Lys Ala Leu  
 565 570

<210> 3

<211> 1995

<212> ADN

5 <213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> fuente

<222> 1...1995

<223> /tipo\_mol= "ADN"

10 /organismo= "Nicotiana tabacum"

<400> 3

atggctgctg ctgcagctgc tccatctcca tctttttcta aaacctgtc ctctctct 60  
 tccaaatctt ctactttgtt gccaaatctt actttcccat tccacatca tccacataag 120  
 actactccac caccattgca ttgactcca actcatattc actcccaaag aagaagattc 180  
 accatctcca acgttatttc taccacccaa aaggtttctg aaactcaaaa ggctgaaacc 240

ES 2 776 361 T3

ttcgtttcta gatttgctcc agatgaacct agaaagggtt ctgatgtttt ggttgaagct 300  
 ttggaagag aagggtgttac cgatgttttt gcttatccag gtgggtgcttc tatggaaatt 360  
 catcaagctt tgaccagatc ctccatcatt agaaatgttt tgccaagaca tgaacaaggt 420  
 ggtgttttcg ctgctgaagg ttatgctaga gctactgggt ttccaggtgt atgtattgct 480  
 acttctggtc caggtgctac taatttggtt tctggttgg ctgatgcttt gttggattct 540  
 gttccaatcg ttgctattac tggccaagtt ccaagaagaa tgattggtac agatgctttc 600  
 caagaaacc caattgtcga agttactaga tctattacca agcacaacta cttggttatg 660  
 gacgttgaag atatcccaag agttgttaga gaagcatttt tcttggttag atctggtaga 720  
 ccaggtccag ttttgattga tgttccaaag gatatccaac aacaattggt tatcccagat 780  
 tgggaccaac ctatgagatt gccaggttat atgtctagat tgccaaagt gccaacgaa 840  
 atgttgttag aacaaatcgt cagattgatc tccgaatcta aaaagccagt cttgtatggt 900  
 ggtggtggtt gttctcaatc tagtgaagaa ttgagaagat tcgtcgaatt gaccggtatt 960  
 ccagttgctt ctacattgat gggtttgggt gcttttccaa ctggtgatga attgtctttg 1020  
 tctatgttgg gtatgcacgg tactgtttat gctaattacg ctggtgattc ctccgatttg 1080  
 ttgtagctt ttggtgttag atctgatgat agagtcactg gtaagttgga agcttttgct 1140  
 tctagagcta agatcgttca tctgcacatt gattccgctg aaatcggtaa aaacaagcaa 1200  
 ccacatgttt ctatctgcgc cgatattaag ttggcattgc aaggtttgaa cagtatcttg 1260  
 gaatccaaag aaggtaaatt gaagttggac ttctctgctt ggagacaaga attgacagtt 1320  
 caaaaggtta agtaccatt gaacttcaag actttcgggt atgctattcc accacaatac 1380  
 gctattcaag ttttggatga attgaccaac ggttccgcta ttatttcaac tgggtttggt 1440  
 caacatcaaa tgtgggctgc tcaatattac aagtacagaa aacctagaca atggttgact 1500  
 tctggtggtt taggtgctat gggttttggt ttgccagctg ctattggtgc tgctgttggt 1560  
 agacctgatg aagttgttgt agatattgat ggtgacggtt ccttcattat gaacgtccaa 1620  
 gaattggcta ccatcaaggt tgaaaatttg ccagtcaaga tcatgttatt gaacaatcaa 1680  
 cacttgggta tggtcgtcca atgggaagat agattttaca aagctaatag agcccacacc 1740  
 tacttgggta atccatctaa tgaagctgaa atcttcccaa acatggtgaa gtttgotgaa 1800  
 gcttgtggtg ttccagctgc aagagttact catagagatg atttgagagc tgccatccaa 1860  
 aagatgttgg atactccag tccatacttg ttggatgta ttgtcccaca tcaagaacat 1920  
 gtcttgccaa tgattccatc tgggtgtgcc tttaaagatg ttattactga aggtgacggt 1980  
 agatcctctt actga 1995

<210> 4

<211> 664

<212> PRT

5 <213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> fuente

<222> 1...664

<223> /tipo\_mol= "proteína"

/organismo= "Nicotiana tabacum"

<400> 4

```

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

```



ES 2 776 361 T3

atgagaggtt acaacccaaa ggttttgcct aacaagatac aattggataa attgacacaa 660  
gccatctccg aagctgaaag accattcatt ttggcaggtg gtgggttagt ttatagtggg 720  
ggtcataaag ccttatacga atttgttaga aagactgaaa tocctatcac tacaacctta 780  
ttgggtttag gtgggtttccc atcaggtcat gaattgtgga ctgggtatgcc tggatgacac 840  
ggtagatata cctccaatca agcaatacaa caatctgatt tgttgatctg tattggtgct 900  
agatttgatg acagagttac tggtaaattg gatgggtttcg caccacaagc caaaattgta 960  
catatagata tcgaccctgc agaaataggt aaaaatggtg cagccgatat tccaatagta 1020  
ggtagacgta aggctgtcct agaattattg aaccaagatg ttaagagagc cgatagagct 1080  
gacgcatgga gagcacaat ccaacattgg aagaacgaaa agccatattc ctacaaggat 1140  
agtgaaacag ttttgaaacc tcaatgggtc gtagaattat tggatgaaac tacaagggt 1200  
ggtagctattg tcaccactga cgtaggtcaa caccaaatgt gggctgcaca atactacaag 1260  
tttaatcaac caagatcatg ggttacatca ggtgggttag gtactatggg ttttggtttc 1320  
ccatctgcta ttgggtgcaca aatggccaat cctgatagat tggttatctc tattaacggg 1380  
gacggtggtg tgcaaatgtg ttcacaagaa ttagctatctt gcgctattaa taacatccca 1440  
gtaaagatcg ttatcattaa taaccaagtt ttgggtatgg tcagacaatg gcaagaattg 1500  
atctataaca acagatactc tcatattgat ttggctgggt cacctgactt tgtcaaattg 1560  
gccgaagcct atgggtgtaa gggtttaaga gcaaccaata aggaagaagc cagaagagct 1620  
tggcaagaag cattggatag tccaggtcct gttgtcgtag aatttgttgt ctctaaagaa 1680  
gaaaacgttt atccaatggt tacacaaggt tccacaatag accaaatggt gatgggtgac 1740  
gaatga 1746

<210> 6

<211> 581

<212> PRT

5 <213> Paenibacillus polymyxa

<220>

<221> fuente

<222> 1...581

<223> /tipo\_mol= "proteína"

10 /organismo= "Paenibacillus polymyxa"

<400> 6

Met	Ser	Ala	Gln	Ile	Pro	Glu	Val	Arg	Ser	Thr	Asn	Glu	Leu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Lys	Trp	Met	Lys	Pro	Glu	Val	Ile	Thr	Gly	Ser	Glu	Ile	Leu	Leu	Arg
			20					25					30		
Ser	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Asp	Cys	Val	Phe	Gly	Tyr	Pro	Gly	Gly
		35					40					45			
Ala	Val	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Ala	Met	Tyr	Gly	Phe	Lys	Asp	Phe	Lys
		50				55					60				
His	Val	Leu	Thr	Arg	His	Glu	Gln	Gly	Ala	Ile	His	Ala	Ala	Asp	Gly



ES 2 776 361 T3

<220>

<221> fuente

<222> 1...860

<223> /tipo\_mol: "ADN"

5 /organismo= "Brevibacillus brevis"

<400> 7

```

atgggtaaga agaacattat tacctctatc acctccttgg ctttggttgc tggtttgtct      60
ttgactgctt ttgctgctac tactgctact gttccagctc caccagctaa acaagaatct      120
aaaccagctg ttgctgctaa tccagctcct aagaatggtt tgttccaata ctctaccatc      180
aacgccttga tgttgggtca atttgaaggt gatttgacct tgaaggactt gaagttgaga      240
ggtgatatgg gtttgggtac tatcaatgat ttggacggtg aatgatcca aatgggtact      300
aagttctacc aaatcgattc taccggtgaa ttgtctgaat tgccagaatc tgtaagact      360
ccattcgctg ttactactca cttcgaacct aaagaaaaga ctacctgac caacgtccaa      420
gactacaatc aattgaccaa gatggttgaa gaaaagttcg aaaacaagaa cgttttctac      480
gccgttaagt tgactggtac tttcaaaatg gttaaggcta gaaccgttcc taagcaaact      540
agaccatata cacaattgac tgaagtcacc aagaagcaat ccgaatttga attcaagaac      600
gtcaagggta ctttgatcgg tttttacact ccaaattatg ctgctgcttt gaacgttcca      660
ggttttctac tgcatttcat taccgaagat aagacctctg gtggctcatgt tttgaacttg      720
caatttgata acgccaactt ggaaatctcc ccaatocatg aatttgatgt tcaattgcca      780
cacaccgatg atttgcctca ttctgatttg actcaagtta ctacctccca agttcatcaa      840
gctgaatctg aaagaaagta

```

<210> 8

<211> 286

10 <212> PRT

<213> Brevibacillus brevis

<220>

<221> fuente

<222> 1...286

15 <223> /tipo\_mol= "proteína"

/organismo= "Brevibacillus brevis"

<400> 8

```

Met Gly Lys Lys Asn Ile Ile Thr Ser Ile Thr Ser Leu Ala Leu Val
1          5          10          15
Ala Gly Leu Ser Leu Thr Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro
20          25          30
Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Ala Val Ala Ala Asn Pro

```

ES 2 776 361 T3

35 40 45  
 Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met  
 50 55 60  
 Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile  
 85 90 95  
 Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser  
 100 105 110  
 Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val Thr Thr His Phe  
 115 120 125  
 Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln  
 130 135 140  
 Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys Ala Arg Thr Val  
 165 170 175  
 Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys  
 180 185 190  
 Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe  
 195 200 205  
 Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro Gly Phe His Leu  
 210 215 220  
 His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His Val Leu Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile His Glu Phe Asp  
 245 250 255  
 Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser Asp Leu Thr Gln  
 260 265 270  
 Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu Arg Lys  
 275 280 285

<210> 9

<211> 783

<212> ADN

5 <213> Enterobacter aerogenes

<220>

<221> fuente

<222> 1...783

<223> /tipo\_mol= "ADN"

10 /organismo= "Enterobacter aerogenes"

<400> 9

atgatgatgc actcctccgc ctgcgactgt gaagcaagtt tatgcgaaac attgagaggt 60  
 ttttccgccca agcaccacaga ttccgttata tatcaaacat ccttgatgag tgctttgtta 120  
 tctggtgtct acgaaggtga cactacaatc gcgacttgt tagctcatgg tgactttggt 180  
 ttgggtactt ttaatgaatt agacggtgaa atgatcgcat tttcttcaca agtttaccaa 240  
 ttgagagctg atggttcagc aagagctgca aaaccagaac aaaagacacc ttttgagtc 300  
 atgacctggt tccaaccaca atacagaaaa acttttgatg cccagtttc aagacaacaa 360  
 attcacgatg taatagacca acaaatccct tcagataatt tgttttgtgc cttgagaata 420  
 gacgtaact tcagacatgc tcacaccaga actgttccaa gacaaactcc acctataga 480  
 gccatgacag atgtattgga tgaccaacct gtttttagat tcaatcaaag agaaggtgtt 540  
 ttagtcggtt ttagaacccc acaacacatg caaggtatca acgtagcagg ttatcatgaa 600

ES 2 776 361 T3

cacttcatta ctgatgacag acaagtggt ggtcatttgt tagattacca attggaatcc 660  
 ggtgttttga cattcgggtga aatccacaag ttgatgattg atttgccagc cgacagtgct 720  
 ttcttacaag ccaacttaca cccatcaaac ttagacgccg caatcagatc agtagaaaac 780  
 taa 783

<210> 10

<211> 260

<212> PRT

5 <213> Enterobacter aerogenes

<220>

<221> fuente

<222> 1...260

<223> /tipo\_mol= "proteína"

10 /organismo= "Enterobacter aerogenes"

<400> 10

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

<210> 11

<211> 666

15 <212> ADN

<213> Lactococcus lactis

## ES 2 776 361 T3

<220>

<221> fuente

<222> 1...666

<223> /tipo\_mol= "ADN"

5 /organismo= "Lactococcus lactis"

<400> 11

```

atgtcatcga gaatctttca acacaatacc ttcacaactt tgagtagcgg attttacaaa      60
ggcacaatca cgttgaaaga agccttagaa cacggatcag ttggcatagg tacattagat      120
actgcaaatg gtgaagttac catcatcaac ggtatagcct atcatggaga ttcggaaaac      180
catgtgagat tggtggaaga ggatgaaacg atgccttatg tcgctatggg tgaacatcaa      240
cccattgcaa agttcactga ttcctctgtg tcaaatagcg aagatttctt atccgcttta      300
accaaagggt ttccaaccgt taatactgcc tacacaattg tcatgactgg tcagtttaag      360
gaagtaactg tctcttctaa accagcgaac aatactagac catatgacga aataatggct      420
gatcaaccgt actttacaaa ggagaacatt agtgggtacaa tggttggtgt atgggctcct      480
aaacatctta ctgatctatt tgggttaggc tttcaccttc acttcgtttc tgacgataag      540
acgtttactg cacatgtaca gaatttcatt acagagaatc tggaaattga gatagggaaa      600
attaccaaga ttgaccaaga atttcctgat gatgacgaga acttcgacca acatttgttc      660
caataa
    
```

<210> 12

<211> 221

10 <212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> fuente

<222> 1...221

15 <223> /tipo\_mol= "proteína"

/organismo= "Lactococcus lactis"

<400> 12

ES 2 776 361 T3

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

<210> 13

<211> 771

5 <212> ADN

<213> Enterobacter aerogenes

<220>

<221> fuente

<222> 1...771

10 <223> /tipo\_mol= "ADN"

/organismo= "Enterobacter aerogenes"

<400> 13

ES 2 776 361 T3

```

atgggcaaag tagcgtagt gacaggtgct ggtcaaggca ttggaaaggc cattgccttg      60
agattggtta aagatggctt tgcggtcgct atagccgatt acaacgatgt gactgctaaa      120
gccgttgcaag acgagatcaa tcaacacgga ggtagagcta tagctgtcaa agttgacgtc      180
agtgatagag aacaggtttt cgctgctgta gaacaagcac gtaaacggtt aggcggtttt      240
aacgtcatcg tcaataatgc gggagtagca ccatcaacc ctatagagtc cattacacc      300
gaaatagtgg acaaagtgta caacatcaat gttaaggggtg tgatttgggg tattcaagcc      360
gcagttgaag cattcaagaa agaaggcat ggtggcaaga tcattaacgc ctgttcacaa      420
gcaggacatg taggcaatcc ggaattagcg gtttactctt cgtctaagtt tgctgttaga      480
gggtaaaccc agacagctgc tagagatctt gcacctcttg gtatcactgt aacggttat      540
tgcccaggta ttgtcaaaac accaatgtgg gcagagatag ataggcaagt atctgaagct      600
gcagggaaac ctctaggata tggtagctgc gaatttgcca agaggattac gttgggtaga      660
ctatctgagc cagaagatgt tgctgcttgt gtttcctatt tggcaagtcc cgactcagac      720
tatatgactg gacagagctt gctgattgat ggtgggatgg ttttcaatta a          771

```

<210> 14

<211> 256

<212> PRT

5 <213> Enterobacter aerogenes

<220>

<221> fuente

<222> 1...256

<223> /tipo\_mol= "proteína"

10 /organismo= "Enterobacter aerogenes"

<400> 14

```

Met Gly Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Gly Gln Gly Ile Gly Lys
1           5           10           15
Ala Ile Ala Leu Arg Leu Val Lys Asp Gly Phe Ala Val Ala Ile Ala

```

ES 2 776 361 T3

```

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

```

<210> 15

<211> 1053

<212> ADN

5 <213> Paenibacillus polymyxa

<220>

<221> fuente

<222> 1...1053

<223> /tipo\_mol= "ADN"

10 /organismo= "Paenibacillus polymyxa"

<400> 15

```

atgtctgctt tgagatggca tgggtgtaag gatttgagat tggaaaacat tgaacaacca      60
gctgctttgc caggtaaggt taagattaag gttgaatggt gtggtatttg cggttctgac      120
ttgcatgaat atgttgctgg tccaattttc attccagaaa acgctcaaca tccattgact      180
ggtgaaaaag ctccaatagt tatgggtcat gaattctccg gtcaagttgt tgaattggt      240
gaaggtgtta ccaagatcca agttggtgat agagttggtg ttgaaccagt ttttgcttgc      300
ggtgaatgtg atgcttgtag acaaggtaaa tacaacttgt gcgataagat gggttttttg      360
ggtttgccg gtggcggtgg tggtttttct gaatacgttg cagctgatga acatatggtt      420
cacaagattc cagaatccgt cagttttgaa caaggtgctt tggttgaacc atctgctggt      480
gcattatatg ccgtagaca atcccaattg aaagtgggtg ataaggctgt tgtttttggt      540
gctggtccta ttggtttgtt ggttattgaa gctttgaagg cttctggtgc ttctgaaatc      600
tatgctgttg aattgtccga agaaagaaag gctaaagctg aagaattggg tgccatagtt      660

```

ES 2 776 361 T3

ttagatccaa agacctatga tgtcgtcgaa gaattgcata agagaactaa tgggtggtgtt 720  
 gatgttgctt acgaagttac tgggtgtcca ccagttttga ctcaagctat tgaatccact 780  
 aagatctctg gtcaaatcat gatcgtcagt atcttcgaaa aagaagcccc tattaagcca 840  
 aacaacatcg tcatgaagga aagaaacttg actggtatca tcggttacag agatgttttc 900  
 ccagctgtta tctctttgat ggaaaagggt tattttccag ccgataagtt ggtcactaag 960  
 agaatcaaat tggaagaagt catcgaacaa ggtttcgaag gtttgttgaa agaaaagaat 1020  
 caagttaaga tcttggtttc cccaaaggcc taa 1053

<210> 16

<211> 350

<212> PRT

5 <213> Paenibacillus polymyxa

<220>

<221> fuente

<222> 1...350

<223> /tipo\_mol= "proteína"

10 /organismo= "Paenibacillus polymyxa"

<400> 16

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



ES 2 776 361 T3

/organismo= "Klebsiella oxytoca"

<400> 18

```

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

```

5 <210> 19

<211> 1149

<212> ADN

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

10 <221> fuente

<222> 1...1149

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/organismo= "Saccharomyces cerevisiae"

<400> 19

ES 2 776 361 T3

atgagagctt tggcatatth caagaagggt gatattcact tcactaatga tatccctagg 60  
ccagaaatcc aaaccgacga tgaggttatt atcgacgtct cttggtgtgg gatttgtggc 120  
tcggatcttc acgagtactt ggatggtcca atcttcatgc ctaaagatgg agagtgccat 180  
aaattatcca acgctgcttt acctctggca atgggccatg agatgtcagg aattgtttcc 240  
aaggttggtc ctaaagtgac aaaggagaag gttggcgacc acgtggtcgt tgatgctgcc 300  
agcagttgtg cggacctgca ttgctggcca cactccaaat tttacaatc caaacatgt 360  
gatgcttgtc agaggggcag tgaaaatcta tgtaccacg cgggttttgt aggactaggt 420  
gtgatcagtg gtggctttgc tgaacaagtc gtagtctctc aacatcacat tatccoggtt 480  
ccaaaggaaa ttctctaga tgtggctgct ttagttgagc ctctttctgt cacctggcat 540  
gctgtaaga tttctggttt caaaaaaggc agttcagcct tggttcttgg tgcaggtccc 600  
attgggttgt gtaccatttt ggtacttaag ggaatggggg ctagtaaaat tgtagtgtct 660  
gaaattgcag agagaagaat agaaatggcc aagaaactgg gcgttgaggt gttcaatccc 720  
tccaagcacg gtcataaatc tatagagata ctacgtgggt tgaccaagag ccatgatggg 780  
tttgattaca gttatgattg ttctggtatt caagttactt tcgaaacctc tttgaaggca 840  
ttaacattca aggggacagc caccaacatt gcagtttggg gtccaaaacc tgtcccattc 900  
caaccaatgg atgtgactct ccaagagaaa gttatgactg gttcgcgcgg ctatggtgtc 960  
gaagacttgc aagaagttgt tcgtgccatc cacaacggag acatcgccat ggaagattgt 1020  
aagcaactaa tcaactgtaa gcaaggatt gaggacgggt gggaaaaggg attccaagag 1080  
ttgatggatc acaaggaatc caacgttaag attctattga cgcctaaca tcacggtgaa 1140  
atgaagtaa 1149

<210> 20

<211> 381

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> fuente

<222> 1...381

10 <223> /tipo\_mol= "proteína"

/organismo= "Saccharomyces cerevisiae"

<400> 20

ES 2 776 361 T3

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

<210> 21

<211> 1341

5 <212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> fuente

<222> 1...1341

10 <223> /tipo\_mol= "ADN"

/organismo= "Lactococcus lactis"

<400> 21

ES 2 776 361 T3

atgggtattg tcgtaatagg tactaaccat gccggaatag ctacagcaaa taccttaatc 60  
gaccaatatc caggacatga aattgttatg attgacagaa actcgaatat gagttatctt 120  
ggctgtggta cagcgatttg gggtgggaga caaatcgaga aacctgatga acttttctat 180  
gcaaaagcag aagatttcga aaagaagggt gttaaaatcc tgaccgagac tgaagtgtca 240  
gaaatcgact ttaccaacaa aatgatatat gccaaaagca agactgggga gaaaatcacg 300  
gaatcttatg ataagctagt attggcaaca ggaagcagac caatcatacc caatttgctt 360  
ggtaaagatc ttaaaggaat tcatttctta aagtatttcc aggaaggtca agccattgac 420  
gaagaattcg caaagaatga cgtgaaaaga atcgcggtaa ttggtgctgg ttatattgga 480  
acagagatag ctgaagcagc taaacgtaga gggaaagaag tgttgttggt tgatgctgaa 540  
agtacctcat tagcgtcata ctacgacgaa gaatttgcca aaggcatgga tgaaaatttg 600  
gcacaacacg ggattgagtt gcactttggt gaacttgccc aagagttcaa ggcaaatgaa 660  
gaaggtcatg tctcccagat tgttacaaac aaatccactt atgatgtgga tctggtcatc 720  
aattgcatag gatttactgc caattcagcc ttagctgggt agcatctaga aacgtttaag 780  
aacggtgcca taaagggtta taagcatcaa caatctagt atccagacgt gtatgcagtt 840  
ggtgatggtg caactatcta ctctaacgct ttgcaagact ttacttacat cgctttagct 900  
agcaatgctg ttagatcagg cattgttgct ggacacaata ttggcggtaa atccatagaa 960  
tctgtcgggtg ttcagggtag taacggcatt tctatattcg gatacaatat gacaagtact 1020  
ggtttatcag taaaagctgc taagaagatt ggtctagaag tctccttttc tgattttgaa 1080  
gataagcaaa aggcttggtt tctgcatgag aacaatgatt cgggtcaaaaat aaggatcgta 1140  
tacgaaacaa aatccaggag aataattggc gcacaattgg catcgaaatc agagattata 1200  
gcgggcaaca ttaacatggt ctctttagcc attcaggaaa agaaaacgat tgatgagtta 1260  
gccctattgg atttgttctt tctgcctcac ttaactctc cgtacaatta tatgaccgta 1320  
gctgcgttga atgctaaata a 1341

<210> 22

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> fuente

<222> 1...446

10 <223> /tipo\_mol= "proteína"

/organismo= "Lactococcus lactis"

<400> 22

ES 2 776 361 T3

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

<210> 23

<211> 1380

5 <212> ADN

<213> Streptococcus pneumoniae

<220>

<221> fuente

<222> 1...1380

ES 2 776 361 T3

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/organismo= "Streptococcus pneumoniae"

<400> 23

```

atgtctaaga tagtggtagt tggtgctaac catgcaggaa ctgcttgcac caatacgatg      60
ttggataatt tcggcaatga aatgagata gtggtgtttg atcagaattc caacatcagc     120
tttctaggtt gtggtatggc gttatggatt ggggagcaaa tagatggtgc tgaagggttg     180
ttttactcag acaaagagaa attggaagcc aaaggtgccca aagtctacac gaattcgcca     240
gtcctgagta tagactatga caacaaagtg gtaactgcag aagtagaagg caaagagcac     300
aaagaatcct atgagaaact gatccttgct actggttcaa caccgatttt accacctatt     360
gaaggagtcg agatcgtaa aggtaataga gaatttaagg ccacacttga aaactgataa     420
tttgtaagt tgtatcagaa tgctgaagaa gtcacaca agctttcaga taaaagccag     480
catttagata ggattgctgt tgttgagggt ggatacattg gtggtgaatt ggctgaagcc     540
tttgaaagac taggaaaaga agttgtgta gttgacattg tggacactgt cttaaaccggg     600
tattatgaca aagatttcac ccaaatgatg gccaaagaatc ttgaggatca caacattaga     660
cttgctttag gccaaacagt gaaggctatt gaaggcgatg gtaaggtaga aaggttgatt     720
acagacaagg agtctttcga tgttgacatg gtcattttag cagtaggatt tagaccaaac     780
actgctttgg cagatgggaa aattgaattg tttagaaatg gtgcttttct ggtggataag     840
aaacaagaaa cttcaatacc cgatgtttat gcagttgggt attgtgcaac agtctatgat     900
aatgccagaa aggatacttc ctacatagca ttggcatcta atgcagttag aacgggcatt     960
gttggtgctt ataatgcctg tggatcatgaa ttggagggca ttggtgtcca aggttctaatt    1020
ggatatacga tttatggcct tcatatgggt agtacgggat tgactctgga gaaggccaaa    1080
gctgctggat acaatgcgac agaaacaggt ttcaacgatt tacagaagcc agagtttatg    1140
aaacacgaca accatgaagt agcgatcaaa atcgtatattg acaaggattc tcgtgaaatt    1200
ctaggggcac aaatggtttc acacgatata gcgataagta tgggcatcca tatgttctct    1260
ctagcgattc aagaacatgt taccatagat aaattagcat taaccgatct attcttcttg    1320
5  cctcatttca acaaacctta caattacatc acgatggcag ctttgaccgc cgaaaagtaa    1380

```

<210> 24

<211> 459

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

10 <220>

<221> fuente

<222> 1...459

<223> /tipo\_mol= "proteína"

/organismo= "Streptococcus pneumoniae"

15 <400> 24

ES 2 776 361 T3

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

<210> 25

<211> 1341

5 <212> ADN

<213> Enterococcus faecalis

<220>

<221> fuente

ES 2 776 361 T3

<222> 1...1341

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/organismo= "Enterococcus faecalis"

<400> 25

	atgtctgtgg ttgtcgtagg ctgtacacat gctggtacta gtgcagtgaa atctatccta	60
	gctaatacatc ccgaagctga agtcactggt tatgaacgta atgacaacat atccttcttg	120
	tcttgtggaa ttgcacttta tgttggagggt gtagttaaga atgctgccga cttattttac	180
	agcaatcctg aggaattagc cagtttagga gccactgtga aaatggaaca caacgtagaa	240
	gagatcaatg tcgatgataa gacagttacg gcaaagaatc tacaacagg tgcaacagaa	300
	accgtaacct acgataagtt ggtcatgact actggaagtt ggcctataat tccaccaata	360
	cccggaattg atgctgagaa cattctactt tgcaagaatt attctcaagc gaatgtcatt	420
	atcgaaaagg ccaaagatgc gaaaagagtc gttgtcgttg gtggtggcta tatttgtata	480
	gagttagttg aagcttttgt tgaaagcggg aaacagggtga ccctagttga tggctagac	540
	aggattttga acaagtattt ggacaaaccg tttactgatg ttttagaaaa ggagttagtt	600
	gatagaggtg tgaacttagc cttaggtgaa aatgtccaac agttttagc tgatgaacag	660
	ggaaaagttg caaaagttat cactccatct caagaattcg aagcagacat ggtcataatg	720
5	tgtgttggtt ttagacccaa taccgaactt ttgaaagaca aagttgatat gttgcctaac	780
	ggtgcaattg aggttaacga gtatatgcaa acgtccaatc cagatatctt tgctgctggt	840
	gattcagccg tagtgcatta caaccatcg caaacgaaga attatattcc cttagcgact	900
	aatgcagtaa gacaggggat gttggtgggg agaaacttga cagaacagaa acttgccat	960
	agaggcaacc aaggtacgtc tggcctgtac ttgttcggtt ggaaaattgg ctcaacagga	1020
	gtaaccaaag aatcggcaaa attgaatggg ttagatggtg aagctacagt ctttgaggat	1080
	aactatagac ctgaattcat gccacaacc gaaaaggtgc tgatggagct ggtgtacgaa	1140
	aaggggactc aaaggatagt aggtgggcaa ttgatgtcca aatacgatat cactcaatca	1200
	gcgaatacac ttctattggc tgtacagaac aaaaagaccg ttgaagatct ggctatttca	1260
	gacttcttct ttcaaccgca ctttgaccgt ccttggaaatt acttaaattt gctagcccaa	1320
	gcagctctgg agaacatgta a	1341

<210> 26

<211> 446

<212> PRT

10 <213> Enterococcus faecalis

<220>

<221> fuente

<222> 1...446

<223> /tipo\_mol= "proteína"

15 /organismo= "Enterococcus faecalis"

ES 2 776 361 T3

<400> 26

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

<210> 27

5 <211> 1356

<212> ADN

<213> Lactobacillus brevis

<220>

<221> fuente

ES 2 776 361 T3

<222> 1...1356

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/organismo= "Lactobacillus brevis"

<400> 27

	atgtctaagg ttaccgtggt aggttgtaga catgccggta cttttgcaat caaacagatt	60
	ttggcagaac atcctgatgc agaagtaaca gtctatgaga gaaatgacgt gattagcttc	120
	ttgtcgtgtg gcatagcgtt gtacttgggt gggaaagttg ctgaccctca agggcttttc	180
	tactcatcac cagaagagtt acaaaagctt ggggcgaatg tccaaatgaa ccacaacggt	240
	ttagcgatag atccagatca aaagactggt actggtgaag atctaacgag tcatgctcag	300
	acaacagaat cctatgacaa gttagtcatg acttcagggt cttggccgat agttcccaa	360
	ataccaggtt ttgactccga tagagtcaag ctgtgcaaga attgggctca tgcacaagct	420
	ttgattgaag atgctaaaga agcgaaaaga attactgtca ttggcgctgg ttatatcggg	480
	gccgaattgg ccgaagcgtt ttctactaca ggtcacgacg taacgttgat agacgcaatg	540
	gatagagtaa tgcccaaata ctttgatgca gattttaccg atgtcattga gcaagattat	600
	cgtgatcatg gagtgcaatt agccttgagt gaaactggtg aatcgtttac agacagtgct	660
5	acaggattga ccataaagac tgacaagaat agttacgaaa cagatcttgc catcttatgc	720
	attggcttta gaccaaatac ggatctgctg aaaggaaaag ttgatatggc accaaatggt	780
	gctattatta cogatgacta tatgocgtcc tctaaccgg acatatttgc tgcaggagac	840
	tctgctgcag ttcactataa ccctacacac cagaatgcat atatcccact agccacaaat	900
	gctgtgagac aaggtatatt agtaggcaag aatttgggtca aaccgaccgt taaatacatg	960
	ggtagcгаа gctcttcagg tcttgccctg tacgatagga ctattgtttc gaccggctta	1020
	acgctagcag cagctaaaca acaggggtgtt aatgctgaac aggtgatcgt tgaggacaat	1080
	tatagacctg agtttatgcc ttcaactgaa cccgtgctaa tgagcttagt ctttgatcca	1140
	gatactcata ggatcttagg aggagctttg atgtccaaat acgatgtatc ccagtctgca	1200
	aacaccttgt ctgtgtgtat ccaaaaacgag aatactattg atgacttagc catggttgat	1260
	atgcttttcc aacctaactt cgatagacca ttcaactatc taaacatfff ggctcaagct	1320
	gctcaagcca aagtagctca atcagtaaac gcctag	1356

<210> 28

<211> 451

<212> PRT

10 <213> Lactobacillus brevis

<220>

<221> fuente

<222> 1...451

<223> /tipo\_mol= "proteína"

15 /organismo= "Lactobacillus brevis"

ES 2 776 361 T3

<400> 28

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

<210> 29

5 <211> 550

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 776 361 T3

<221> fuente

<222> 1...550

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "pENO2"

5 /organismo= "Secuencia artificial"

<400> 29

```
cgctcagcat ctgcttcttc ccaaagatga acgcggcggt atgtcactaa cgacgtgcac      60
caacttgagg aaagtggaat cccgttccaa aactggcatt cactaattga tacatctaca      120
caccgcacgc ctttttctg aagcccactt tcgtggactt tgccatatgc aaaattcatg      180
aagtgtgata ccaagtcagc atacacctca ctagggtagt ttctttgggt gtattgatca      240
tttggttcat cgtggttcat taattttttt tctccattgc tttctgggtt tgatcttact      300
atcatttgga tttttgtcga aggttgtaga attgtatgtg acaagtggca ccaagcatat      360
ataaaaaaaaa aaagcattat cttcctacca gagtgtattg ttaaaaacgt atttatagca      420
aacgcaattg taattaattc ttattttgta tcttttcttc ccttgtctca atcttttatt      480
tttattttat ttttcttttc ttagtttctt tcataacacc aagcaactaa tactataaca      540
tacaataata                                     550
```

<210> 30

<211> 419

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1...419

15 <223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "pTEF2.KI"

/organismo= "Secuencia artificial"

<400> 30

```
ctctctcgca ataacaatga aactgggtc aatcatagcc tacacaggtg aacagagtag      60
cgtttataca gggtttatac ggtgattcct acggcaaaaa tttttcattt ctaaaaaaaa      120
aaagaaaaat ttttctttcc aacgctagaa ggaaaagaaa aatctaatta aattgatttg      180
gtgattttct gagagttccc ttttcatat atcgaatttt gaatataaaa ggagatcgaa      240
aaaatttttc tattcaatct gttttctggt tttatttgat agtttttttg tgtattatta      300
ttatgatta gtactggttt atatgggttt ttctgtataa cttcttttta ttttagtttg      360
tttaacttta ttttgagtta cattatagtt ccctaactgc aagagaagta acattaaaa      419
```

20 <210> 31

<211> 598

## ES 2 776 361 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 5 <222> 1...598  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
       /nota= "pTEF3"  
       /organismo= "Secuencia artificial"  
 <400> 31  
 ggctgataat agcgtataaa caatgcatac tttgtacggt caaaatatac tgcagtagat       60  
 atatttatgc atattacata taatacatat cacataggaa gcaacaggcg cgttggactt       120  
 ttaattttcg aggaccgcca atccttacct cacaccaat cccccacaag tgatccccca       180  
 cacaccatag ctcaaaaatg tttctactcc ttttttactc ttccagattt tctcggactc       240  
 cgcgcatcgc cgtaccactt caaaacaccc aagcacagca tactaaattt ccctctttc       300  
 ttcctctagg gtgtcgttaa ttacccttac taaaggtttg gaaaagaaaa aagagaccgc       360  
 ctcgtttctt tttcttcgtc gaaaaaggca ataaaaattt ttatcacggt tctttttctt       420  
 gaaaattttt ttttttgatt tttttctctt tcgatgacct cccattgata ttttaagtaa       480  
 taaacggtct tcaatttctc aagtttcagt ttcatttttc ttgttctatt acaacttttt       540  
 10 ttacttcttg ctcatagaa agaaagcata gcaatctaata ctaagtttta attacaaa       598  
 <210> 32  
 <211> 700  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1...700  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
       /nota= "pADH1"  
 20       /organismo= "Secuencia artificial"  
 <400> 32

ES 2 776 361 T3

gggtgtacaa tatggacttc ctcttttctg gcaaccaaac ccatacatcg ggattcctat 60  
 aataccttcg ttggctctccc taacatgtag gtggcggagg ggagatatac aatagaacag 120  
 ataccagaca agacataatg ggctaaacaa gactacacca attacactgc ctcattgatg 180  
 gtggtacata acgaactaat actgtagccc tagacttgat agccatcatc atacgaagt 240  
 ttcactaacc tttttccatt tgccatctat tgaagtaata ataggcgcac gcaacttctt 300  
 ttcttttttt ttctttttctc tctccccctg tgttgtctca ccatatccgc aatgacaaaa 360  
 aatgatgga agacactaaa ggaaaaaatt aacgacaaag acagcaccaa cagatgctgt 420  
 tgttccagag ctgatgaggg gtatctcgaa gcacacgaaa ctttttcctt ccttcattca 480  
 cgcacactac tctctaata gcaacggtat acggccttcc ttccagtac ttgaatttga 540  
 aataaaaaaa agtttgctgt cttgctatca agtataaata gacctgcaat tattaatctt 600  
 ttgtttcctc gtcattgttc tcgttccctt tcttcttctg ttctttttct gcacaatatt 660  
 tcaagctata ccaagcatac aatcaactat ctcatataca 700

<210> 33

<211> 549

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1...549

<223> /tipo\_mol= "ADN"

10 /nota= "pGPM1"

/organismo= "Secuencia artificial"

<400> 33

gccaacttt tcggttaaca catgcagtga tgcacgcgcg atgggtgctaa gttacatata 60  
 tatatatata tatatatata tatatatata gccatagtga tgtctaagta acctttatgg 120  
 tatatttctt aatgtggaaa gatactagcg cgcgcaccca cacacaagct tcgtcttttc 180  
 ttgaagaaaa gaggaagctc gctaaatggg attccacttt ccgttccctg ccagctgatg 240  
 gaaaaagggt agtggaacga tgaagaataa aaagagagat ccactgaggt gaaatctcag 300  
 ctgacagoga gtttcatgat cgtgatgaac aatggtaacg agttgtggct gttgccaggg 360  
 aggggtggtc tcaactttta atgtatggcc aaatcgctac ttgggtttgt tatataacaa 420  
 agaagaaata atgaactgat tctcttctc cttcttctcc tttcttaatt ctgttgaat 480  
 taccttctt tgtaattttt tttgtaatta ttcttcttaa taatcacaac aaacacacat 540  
 attacaata 549

15 <210> 34

<211> 650

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1...650

5 <223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "pFBA1"

/organismo= "Secuencia artificial"

<400> 34

acgcaagccc taagaaatga ataacaatac tgacagtact aaataattgc ctacttggct	60
tcacatacgt tgcatacgtc gatatagata ataatagataa tgacagcagg attatcgtaa	120
tacgtaaatag ttgaaaatct caaaaatgtg tgggtcatta cgtaaataat gataggaatg	180
ggattcttct atttttcctt tttccattct agcagccgtc gggaaaacgt ggcatcctct	240
ctttcgggct caattggagt cagcgtgccc tgagcatcct ctctttccat atctaacaac	300
tgagcacgta accaatggaa aagcatgagc ttagcgttgc tccaaaaaag tattggatgg	360
ttaataccat ttgtctgttc tcttctgact ttgactctc aaaaaaaaaa aatctacaat	420
caacagatcg cttcaattac gccctcacia aaactttttt ccttcttctt cgeccacggt	480
aaattttatc cctcatgttg tctaaccgat ttctgcactt gatttattat aaaaagacaa	540
agacataata cttctctatc aatttcagtt attgttcttc cttgcgttat tcttctgttc	600
ttctttttct tttgtcatat ataaccataa ccaagtaata catattcaaa	650

10 <210> 35

<211> 700

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> fuente

<222> 1...700

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "pPDC1"

/organismo= "Secuencia artificial"

20 <400> 35

ttatttacct atctctaaac ttcaacacct tatatcataa ctaatatctc ttgagataag	60
cacactgcac ccataccttc cttaaaaacg tagcttccag tttttggtgg ttccggettc	120

ES 2 776 361 T3

ottccccgatt ccgccccgcta aacgcatatt tttgttgccct ggtggcattt gcaaaatgca 180  
 taacctatgc atttaaaaga ttatgatgc tcttctgact tttcgtgtga tgaggctcgt 240  
 ggaaaaaatg aataatttat gaatttgaga acaattttgt gttgttacgg tattttacta 300  
 tggaataatc aatcaattga ggattttatg caaatatcgt ttgaatattt tcccgaccct 360  
 ttgagtactt ttcttcataa ttgcataata ttgtccgctg cccctttttc tgttagacgg 420  
 tgtcttgatc tacttgctat cgttcaacac caccttattt totaactatt ttttttttag 480  
 ctcatattgaa tcagcttatg gtgatggcac atttttgcat aaacctagct gtcctcgttg 540  
 aacataggaa aaaaaaatat ataaacaagg ctctttcact ctccttgcaa tcagatttgg 600  
 gtttgttccc tttattttca tatttcttgt catattcctt totcaattat tattttctac 660  
 tcataacctc acgcaaaata acacagtcaa atcaatcaaa 700

<210> 36

<211> 700

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1...700

<223> /tipo\_mol= "ADN"

10 /nota= "pPGK1"

/organismo= "Secuencia artificial"

<400> 36

gtgagtaagg aaagagtgag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc 60  
 gcgaatcctt tattttggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120  
 ttccctcctt cttgaattga tgttaccctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180  
 aattaccgtc gtcctgatt tgtttgcaa aagaacaaaa ctgaaaaaac ccagacacgc 240  
 tcgacttctt gtcttctat tgattgcagc ttccaatttc gtcacacaac aaggtcctag 300  
 cgacggctca caggttttgt aacaagcaat cgaaggttct ggaatggcgg gaaagggttt 360  
 agtaccacat gctatgatgc ccactgtgat ctccagagca aagttcgttc gatcgtactg 420  
 ttactctctc tctttcaaac agaattgtcc gaatcgtgtg acaacaacag cctgttctca 480  
 cacactcttt tcttctaacc aagggggtgg tttagtttag tagaacctog tgaaacttac 540  
 atttacatat atataaactt gcataaattg gtcaatgcaa gaaatacata tttggtcttt 600  
 tctaattcgt agtttttcaa gttcttagat gctttctttt tctctttttt acagatcctc 660  
 aaggaagtaa ttatctactt tttacaacaa atataaaca 700

<210> 37

15 <211> 535

<212> ADN

ES 2 776 361 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1...535  
 5 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
     /nota= "pRPLA1"  
     /organismo= "Secuencia artificial"  
 <400> 37  
 tcaagttgga tactgatctg atctctccgc cctactacca gggaccctca tgattaccgc 60  
 tcgaatgcga cgtttcctgc ctcataaaac tggcttgaaa atatttattc gctgaacagt 120  
 agcctagctt ataaaaattt catttaatta atgtaatatg aaaactcaca tgccttctgt 180  
 ttctaaaatt gtcacagcaa gaaataacat taccatacgt gatcttatta aactctagta 240  
 tcttgtctaa tacttcattt aaaagaagcc ttaaccctgt agcctcatct atgtctgcta 300  
 catatcgtga ggtacgaata tcgtaagatg ataccacgca actttgtaat gatttttttt 360  
 ttttcatttt ttaaagaatg cttttacatg gtatttgaaa aaaatatctt tataaagttt 420  
 gcgatctctt ctgttctgaa taatttttag taaaagaaat caaaagaata aagaaatagt 480  
 ccgctttgtc caatacaaca gcttaaaccg attatctcta aaataacaag aagaa 535  
 10 <210> 38  
 <211> 383  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <221> fuente  
 <222> 1...383  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
     /nota= "pTEF1"  
     /organismo= "Secuencia artificial"  
 20 <400> 38  
 gtttagcttg cctcgtcccc gccgggtcac ccgcccagcg acatggaggc ccagaatacc 60  
 ctcttgaca gtcttgacgt gcgcagctca ggggcatgat gtgactgtcg cccgtacatt 120  
 tagcccatac atccccatgt ataatcattt gcatccatac attttgatgg ccgcacggcg 180  
 cgaagcaaaa attacggctc ctgcgtgcag acctgcgagc agggaaacgc tcccctcaca 240  
 gacgcgttga attgtcccca cgccgcgccc ctgtagagaa atataaaagg ttaggatttg 300  
 ccactgaggt tcttctttca tatacttctt tttaaatctt tgctacgata cagttctcac 360  
 atcacatccg aacataaaca acc 383  
 <210> 39

<211> 574

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<222> 1...574

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "pTDH3"

/organismo= "Secuencia artificial"

10 <400> 39

```

ctgctgtaac cegtacatgc ccaaaatagg gggcgggta cacagaatat ataacatcgt      60
aggtgtctgg gtgaacagtt tattcctggc atccactaaa tataatggag cccgcttttt      120
aagctggcat ccagaaaaaa aaagaatccc agcaccaaaa tattgttttc ttcaccaacc      180
atcagttcat aggtccattc tcttagcgca actacagaga acaggggcac aaacaggcaa      240
aaaacgggca caacctcaat ggagtgatgc aacctgcctg gagtaaatga tgacacaagg      300
caattgacct acgcatgtat ctatctcatt ttcttacacc ttctattacc ttctgctctc      360
tctgatttgg aaaaagctga aaaaaaagggt tgaaccaggt tccctgaaat tattccccta      420
cttgactaat aagtatataa agacggtagg tattgattgt aattctgtaa atctatttct      480
taaacttctt aaattctact tttatagtta gtcttttttt tagtttttaa acaccaagaa      540
cttagtttgc aataaacaca cataaacaaa caaa      574
    
```

<210> 40

<211> 300

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1...300

<223> /tipo\_mol= "ADN"

20 /nota= "tTHD2"

/organismo= "Secuencia artificial"

<400> 40

```

atttaactcc ttaagttact ttaatgattt agtttttatt attaataatt catgctcatg      60
acatctcata tacacgttta taaaacttaa atagattgaa aatgtattaa agattcctca      120
gggattegat ttttttgtaa gtttttgttt ttttttcctt gagatgctgt agtatttggg      180
aacaattata caatogaaag atatatgctt acattogacc gtttttagccg tgatcattat      240
cctatagtaa cataaacctga agcataactg acactactat catcaatact tgtcacatga      300
    
```

<210> 41  
 <211> 300  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1...300  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
 /nota= "tCYC1"

10 /organismo= "Secuencia artificial"

<400> 41  
 acaggccctt tttcctttgt cgatatcatg taattagtta tgtcacgctt acattcacgc 60  
 cctcctccca catccgctct aaccgaaaag gaaggagtta gacaacctga agtctaggtc 120  
 octatttatt ttttttaata gttatgtag tattaagaac gttatttata tttcaaattt 180  
 ttcttttttt tctgtacaaa cgcgtgtacg catgtaacat tatactgaaa accttgcttg 240  
 agaaggtttt gggacgctcg aaggctttaa tttgcaagct tcgcagtta cactctcatc 300

<210> 42  
 <211> 300

15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1...300

20 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
 /nota= "tTDH3"  
 /organismo= "Secuencia artificial"

<400> 42  
 gtgaatttac tttaaatcct gcattttaat aaattttcct tttatagctt tatgacttag 60  
 tttcaattta tatactatct taatgacatt ttcgattcat tgattgaaag ctttgtgttt 120  
 tttcttgatg cgctattgca ttgttcttgt ctttttcgcc acatgtaata tctgtagtag 180  
 atacctgata cattgtggat gctgagttaa attttagtta ataattggagg cgctcttaat 240  
 aattttgggg atattggcct ttttttttaa agtttataaaa tgaatttttt ccgccaggat 300

25 <210> 43  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 776 361 T3

<220>  
 <221> fuente  
 <222> 1....354  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
 5 /nota= "tADH1"  
 /organismo= "Secuencia artificial"  
 <400> 43  
 actagttcta gagcggccgc caccgcggtg ggogaatttc ttatgattta tgatttttat 60  
 tattaataa gttataaaaa aaataagtgt atacaaattt taaagtgact cttaggtttt 120  
 aaaacgaaaa ttcttattct tgagtaactc tttcctgtag gtcaggttgc tttctcaggt 180  
 atagcatgag gtcgctctta ttgaccacac ctctaccggc atgccgagca aatgcctgca 240  
 aatcgctccc catttcaccc aattgtagat atgctaactc cagcaatgag ttgatgaatc 300  
 tcggtgtgta ttttatgtcc tcagaggaca acacctgttg taatcgttct tcca 354  
 <210> 44  
 10 <211> 299  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 15 <222> 1...299  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
 /nota= "tTPI1"  
 /organismo= "Secuencia artificial"  
 <400> 44  
 gattaatata attatataaa aatattatct tcttttcttt atatctagtg ttatgtaaaa 60  
 taaattgatg actacggaaa gcttttttat attgtttctt tttcattctg agccacttaa 120  
 atttcgtgaa tgttcttgta agggacggtg gatttacaag tgatacaaca aaaagcaagg 180  
 cgctttttct aataaaaaga agaaaagcat ttaacaattg aacacctcta tatcaacgaa 240  
 20 gaatattact ttgtctctaa atccttgtaa aatgtgtacg atctctatat gggttactc 299  
 <210> 45  
 <211> 299  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1...299

ES 2 776 361 T3

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "tMET25"

/organismo= "Secuencia artificial"

<400> 45

gtgtgcgtaa tgagttgtaa aattatgtat aaacctactt tctctcacia gtactatact 60

tttataaaac gaactttatt gaaatgaata tccttttttt cccttggtac atgtcgtgac 120

tcgtactttg aacctaaatt gttctaacat caaagaacag tgtaattcg cagtcgagaa 180

gaaaaaatatg gtgaacaaga ctcatctact tcatgagact actttacgcc tcctataaag 240

5 ctgtcacact ggataaattt attgtaggac caagttacia aagaggatga tggaggttt 299

<210> 46

<211> 305

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> fuente

<222> 1...305

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "tENO2"

15 /organismo= "Secuencia artificial"

<400> 46

ggatcctaaa gtgcttttaa ctaagaatta ttagtctttt ctgcttattt tttcatcata 60

gtttagaaca ctttatatta acgaatagtt tatgaatcta tttaggttta aaaattgata 120

cagttttata agttactttt tcaaagactc gtgctgtcta ttgcataatg cactggaagg 180

ggaaaaaaaaa ggtgcacacg cgtggctttt tcttgaattt gcagtttgaa aaataactac 240

atggatgata agaaaacatg gagtacagtc actttgagaa ctttcaatca gctggtaacg 300

tcttc 305

<210> 47

20 <211> 300

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25 <222> 1...300

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "tMET3"

/organismo= "Secuencia artificial"

ES 2 776 361 T3

<400> 47

```

tcgtcataaa atgctcccat ctcaaaagta gggcaaaatt catgatcgac cgcgcaaaat    60
aaatagattt gcaaaataagt tttgtatgta catttattaa tatatataat atatcaaaag    120
aaaaaaaaatca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ttgactctt attcagtcac caattacaaa    180
acctagagat agcgatgggtg catattcaat aaaaaactcc ttatactgtc gagaaagott    240
attattggta cttctcgaag atactaaaaa aggttaattt ttggagacgg aggcaatagc    300

```

<210> 48

<211> 301

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1...301

10 <223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "tPGK1"

/organismo= "Secuencia artificial"

<400> 48

```

attgaattga attgaaatcg atagatcaat tttttcttt tctctttccc catcctttac    60
gctaaaataa tagtttattt tattttttga atatttttta tttatatacg tatatataga    120
ctattattta tcttttaatg attattaaga tttttattaa aaaaaaatc gctcctcttt    180
taatgccttt atgcagtttt tttttcccat tcgatatttc tatgttcggg ttcagcgtat    240
tttaagtta ataaactcgaa aattctgcgt tcgttaaagc tttcgagaag gatattattt    300
a                                                                    301

```

15 <210> 49

<211> 700

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <221> fuente

<222> 1...700

<223> /tipo\_mol= "ADN"

/nota= "pPYK1"

/organismo= "Secuencia artificial"

25 <400> 49

ES 2 776 361 T3

```

aaaagaaaag attattgaaa gagaaagaaa gaaaaaaaaa aaatgtacac ccagacatcg      60
ggcttccaca atttoggctc tattgttttc catctctcgc aacggcggga ttcctctatg      120
gcgtgtgatg tctgtatctg ttacttaatc cagaaactgg cacttgaccc aactctgcca      180
cgtgggtcgt tttgccatcg acagattggg agatthttcat agtagaattc agcatgatag      240
ctacgtaaam gtgttccgca ccgtcacaaa gtgttttcta ctgtttcttc ttctttcgtt      300
cattcagttg agttgagtga gtgctttggt caatggatct tagctaaaaat gcatatthtt      360
tctcttggtm aatgaatgct tgtgatgtct tccaagtgat ttcctttcct tcccatatga      420
tgctaggtac ctttagtgtc ttcctaaaaa aaaaaaaagg ctcgccatca aaacgatatt      480
cgttggettth tttttctgaa ttataaatac tctttggtaa cttttcattt ccaagaacct      540
ctthttttcca gttatatcat ggtcccctth caaagttatt ctctactctt tttcatatth      600
attctthtttc atcctttggt tttttattct taacttgtht attattctct cttgtttcta      660
tttacaagac accaatcaaa acaataaaaa catcatcaca      700

```

<210> 50

<211> 500

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1...500

<223> /tipo\_mol= "ADN"

10 /nota= "pTPI1"

/organismo= "Secuencia artificial"

<400> 50

```

atttaaactg tgaggacctt aatacattca gacacttctg cggtatcacc ctacttattc      60
ccttcgagat tatatctagc aacctatcag gttggtggaa gattaccctg tctaagactt      120
ttcagcttcc tctattgatg ttacacctgg acacccttht tctggcatcc agttthtaat      180
cttcagtggc atgtgagatt ctccgaaatt aattaaagca atcacacaat tctctcggat      240
accacctcgg ttgaaactga caggtgtht gttacgcatg ctaatgcaaa ggagcctata      300
tacctthtggc tcggtgctg taacagggaa tataaagggc agcataatth aggagthtag      360
tgaacttgca acatthacta tthtcccttc ttacgtaaat atthttctth ttaattctaa      420
atcaatctth ttcaatthtt tghttgatt cthttcttgc ttaaatctat aactacaaaa      480
aacacataca taaactaaaa      500

```

15 <210> 51

<211> 300

<212> ADN

<213> Secuencias artificiales

<220>  
 <221> fuente  
 <222> 1...300  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
 5 /nota= "tDIT1"  
 /organismo= "secuencias artificiales"  
 <400> 51  
 taaagtaaga ggcgtacatt ggtctacctt tttgttcttt tacttaaaca ttagttagtt 60  
 cgttttcttt ttctcatttt tttatgtttc ccccccaaag ttctgatttt ataatatattt 120  
 atttcacaca attccattta acagaggggg aatagattct ttagcttaga aaattagtga 180  
 tcaatatata ttgacctttc ttttcatctt ttcagtgata ttaatggttt cgagacactg 240  
 caatggccct agttgtctaa gaggatagat gttactgtca aagatgatat tttgaatttc 300  
 <210> 52  
 10 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencias artificiales  
 <220>  
 <221> fuente  
 15 <222> 1...33  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
 /nota= "loxP"  
 /organismo= "secuencias artificiales"  
 <400> 52  
 20 ataactcgt ataatgatg ctatacgaag tta 33  
 <210> 53  
 <211> 2085  
 <212> ADN  
 <213> Saccharomyces  
 25 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1...2085  
 <223> /tipo\_mol= "ADN"  
 /nota= "gen HAA-1"  
 30 /organismo= "Saccharomyces"  
 <400> 53

ES 2 776 361 T3

atggtcttga taaatggcat aaagtatgcc tgtgagaggt gcataagagg ccatagagta 60  
acaacatgca atcatacaga tcaaccgctt atgatgatca aacccaaagg tagaccttcc 120  
actacatgcg actattgtaa acaacttoga aaaaacaaga atgcaaatcc tgaaggtgtt 180  
tgcacgtgtg gccggctaga gaagaaaaaa ctggcacaga aagccaaaga agaagcaaga 240  
gctaaagcca aagaaaaaca aagaaaacag tgtacctgcg ggactgatga ggtttgcaa 300  
tatcatgctc aaaagagaca tctaagaaag tcccctcaa gttctcaaaa gaaaggaaga 360  
tccatttctc gttctcaacc aatgtttgaa agggattgtt cttctacttc acttgacagc 420  
aatatgttat ccggccacgg agcactatca gatacctcta gcatactgac gacacattt 480  
ttagacagtg agccgggtgt tggtaaaatt tcaaaagatt accatcatgt cccttcattg 540  
gcctccattt catccttaca atcctcgcaa tcgttagatc aaaatttcag tataaccacia 600  
agcccgcctg tatcttcaat gtcatttaat tttctcacgg gaaatatcaa tgaaccaac 660  
caaaatcaca gtaatcatca gcattcaaaa tcaggcaata actggcaaga tagttcggta 720  
agcttgccag cgaaagctga ttcacgtctt aacatgatgg ataaaaacia ctctgtgggt 780  
cttgacctat taggccattc aaaacgaata tcgccgatat caaactctcg tgtggcgcaa 840  
gttagcgttc cgctagaaga atatattcct tctgacattg atggggttgg aagagttact 900  
gataaaagct ctttggctca cgattggcca tttgatgaaa gtattgagag aaatttcagt 960  
acaaccgcaa ccgctgcaac tggtgaaagt aagttcgaca ttaacgacia ctgtaataga 1020  
attaatagca aaagtatatag taagactaat agtatgaatg gaaacggtat gaacaatagc 1080  
aataataata atatcaacag taatggcaac gacaagaaca ataacaactc ttctagacia 1140  
gaacatcaag gaaatggact atttgacatg tttacagatt catcgtcgat ttcaaccgctt 1200  
tcccgtgcaa acttattatt gcaagaaaaa attggttcgc aagaaaactc tgtcaaaaa 1260  
gaaaactatt cgaaaaatcc tcaactctgt catcaattaa cttccagaag tagatcattt 1320  
attcatcatc oggcaaacga gtatttgaag aatacttttg gaaattcacia tagtaatgac 1380  
atcggaaagg gagttgaagt gctatctttg acaccgagtt ttatggatat tcccgaaaa 1440  
gaaagagaaa cggaaagatc gccatcatcc aattacatta ctgacagacc tttcactcga 1500  
aaacctagat cttctagcat tgacgtaaac cataggtatc cacctatggc accaacaacc 1560  
gtagcgacat ctcccgggtgc attgaacaat gccgtagcaa gcaatctcga cgatcaactg 1620  
agtttaacat cactaaactc tcagccatca tcgatagcaa atatgatgat ggacccttca 1680  
aacctagctg agcaaagttc tattcattca gttcctcagt caataaactc tccgagaatg 1740  
cctaaaactg gaagtgcga agacaagaac attcacacta agaaggaaga aagaaatccg 1800  
ctaaataaca tacacgatct gtcacaattg gaaaatgtac cagacgagat gaaccaaatg 1860  
ttctccccac cattaaaaag tatgaataga ccggatgcca taagggaaaa ttcatttagt 1920  
agtaatttca taatccaagg aatagcatg atctctacgc cttccggaag gaatgacctt 1980  
ccagatacct ctccaatgag tagtattcaa acagcgtcac caccaagtca attactgacc 2040  
gatcaaggat ttgcggattt ggataatttc atgtctcgtt tatga 2085

<210> 54

<211> 694

<212> PRT

<213> Saccharomyces

<220>

<221> fuente

5 <222> 1...694

<223> /tipo\_mol= "proteína"

/nota= "proteína HAA-1"

/organismo= "Saccharomyces"

<400> 54

```

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

```

10

ES 2 776 361 T3

Asn Gly Leu Phe Asp Met Phe Thr Asp Ser Ser Ser Ile Ser Thr Leu  
 385 390 395 400  
 Ser Arg Ala Asn Leu Leu Gln Glu Lys Ile Gly Ser Gln Glu Asn  
 405 410 415  
 Ser Val Lys Gln Glu Asn Tyr Ser Lys Asn Pro Gln Leu Arg His Gln  
 420 425 430  
 Leu Thr Ser Arg Ser Arg Ser Phe Ile His His Pro Ala Asn Glu Tyr  
 435 440 445  
 Leu Lys Asn Thr Phe Gly Asn Ser His Ser Asn Asp Ile Gly Lys Gly  
 450 455 460  
 Val Glu Val Leu Ser Leu Thr Pro Ser Phe Met Asp Ile Pro Glu Lys  
 465 470 475 480  
 Glu Arg Glu Thr Glu Arg Ser Pro Ser Ser Asn Tyr Ile Thr Asp Arg  
 485 490 495  
 Pro Phe Thr Arg Lys Pro Arg Ser Ser Ser Ile Asp Val Asn His Arg  
 500 505 510  
 Tyr Pro Pro Met Ala Pro Thr Thr Val Ala Thr Ser Pro Gly Ala Leu  
 515 520 525  
 Asn Asn Ala Val Ala Ser Asn Leu Asp Asp Gln Leu Ser Leu Thr Ser  
 530 535 540  
 Leu Asn Ser Gln Pro Ser Ser Ile Ala Asn Met Met Met Asp Pro Ser  
 545 550 555 560  
 Asn Leu Ala Glu Gln Ser Ser Ile His Ser Val Pro Gln Ser Ile Asn  
 565 570 575  
 Ser Pro Arg Met Pro Lys Thr Gly Ser Arg Gln Asp Lys Asn Ile His  
 580 585 590  
 Thr Lys Lys Glu Glu Arg Asn Pro Leu Asn Asn Ile His Asp Leu Ser  
 595 600 605  
 Gln Leu Glu Asn Val Pro Asp Glu Met Asn Gln Met Phe Ser Pro Pro  
 610 615 620  
 Leu Lys Ser Met Asn Arg Pro Asp Ala Ile Arg Glu Asn Ser Ser Ser  
 625 630 635 640  
 Ser Asn Phe Ile Ile Gln Gly Asn Ser Met Ile Ser Thr Pro Ser Gly  
 645 650 655  
 Arg Asn Asp Leu Pro Asp Thr Ser Pro Met Ser Ser Ile Gln Thr Ala  
 660 665 670  
 Ser Pro Pro Ser Gln Leu Leu Thr Asp Gln Gly Phe Ala Asp Leu Asp  
 675 680 685  
 Asn Phe Met Ser Ser Leu  
 690

<210> 55

<211> 1089

<212> ADN

5 <213> Kluyveromyces lactis

<220>

<221> fuente

<222> 1...1089

<223> /tipo\_mol= "ADN"

10 /nota= "LEU2.KI"

/organismo= "Kluyveromyces lactis"

<400> 55

ES 2 776 361 T3

atgtctaaga atatogttgt cctaccgggt gatcaogtgc gtaaagaagt tactgacgaa 60  
gctattaagg tcttgaatgc cattgctgaa gtccgtccag aaattaagtt caatttccaa 120  
catcacttga tcgggggtgc tgccatcgat gccactggca ctcccttacc agatgaagct 180  
ctagaagcct ctaagaaagc cgatgctgtc ttactaggtg ctggttgggtg tccaaaatgg 240  
ggtagcggcg cagtttagacc agaacaaggt ctattgaaga tcagaaagga attgggtcta 300  
tacgccaaact tgagaccatg taactttgct tctgattcct tactagatct ttctccttg 360  
aagcctgaat atgcaaaggg taccgatttc gtcgctggtta gagaattggt tgggtggtatc 420  
tactttggtg aaagaaaaga agatgaaggt gacggagttg cttgggactc tgagaaatac 480  
agtgttcctg aagttcaaag aattacaaga atggctgctt tcttggcatt gcaacaaaac 540  
ccaccattac caatctggtc tcttgacaag gctaacgtgc ttgcctcttc cagattgtgg 600  
agaaagactg ttgaagaaac catcaagact gaggctccac aattaactgt tcagcaccaa 660  
ttgatcgact ctgctgctat gattttggtt aaatcaccaa ctaagctaaa cggtgttgtt 720  
attaccaaca acatgttttg tgatattatc tccgatgaag cctctgttat tccaggttct 780  
ttgggtttat taccttctgc atctctagct tccctacctg aactaaciaa ggcattcggg 840  
ttgtacgaac catgtcatgg ttctgccccg gatttaccag caaacaaggt taaccaaat 900  
gctaccatct tatctgcagc tatgatgttg aagttatcct tggatttggg tgaagaaggt 960  
agggctcttg aagaagctgt tagaaatgtc ttggatgcag gtgtcagaac cggtgacctt 1020  
gggtggttcta actctaccac tgaggttggc gatgctatcg ccaaggctgt caaggaaac 1080  
ttggcttaa 1089

<210> 56

<211> 362

5 <212> PRT

<213> *Kluyveromyces lactis*

<220>

<221> fuente

<222> 1...362

10 <223> /tipo\_mol= "proteína"

/nota= "LEU2.KI"

/organismo= "*Kluyveromyces lactis*"

<400> 56

ES 2 776 361 T3

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

**REIVINDICACIONES**

1. Una levadura recombinante que tiene una actividad piruvato descarboxilasa reducida, en cuyo genoma se ha insertado:

- 5 - uno o más ácidos nucleicos que codifican una acetolactato sintasa o ALS,
- uno o más ácidos nucleicos que codifican una acetolactato descarboxilasa o ALD,
- uno o más ácidos nucleicos que codifican una butanodiol deshidrogenasa o BDH, y
- una o más copias de unos ácidos nucleicos que codifican una NADH oxidasa o NOXE,

10 Codificando dicha uno o más copias de unos ácidos nucleicos una NADH oxidasa o NOXE que se selecciona del grupo que consiste en secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos 78%, preferiblemente al menos 80%, de identidad de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:23 que presenta la actividad biológica deseada, y

15 Dicha actividad piruvato descarboxilasa se reduce mediante (i) alteración de al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa insertando en dicho al menos un gen que codifica una piruvato descarboxilasa al menos un constructo de ADN exógeno, (ii) mutaciones en regiones reguladoras, (iii) mutaciones en un codón de partida, principalmente sustituyendo AUG por GUG, (iv) mutaciones en secuencias de codificación que alteran la actividad enzimática (v) mutaciones, inserciones o supresión en la secuencia de codificación que altera la estabilidad de la proteína y (vi) mutaciones que alteran la vida media de ARNm de piruvato descarboxilasa.

20 2. La levadura recombinante según la reivindicación 1, en donde la levadura recombinante dicha comprende uno o más constructos de ADN seleccionados en un grupo que comprende las siguientes fórmulas:

(I) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-3' y 5'-[Gen 2]<sub>x2</sub>-3' y 5'-[Gen 3]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',

(II) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-[Gen 3]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',

(III) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-3' y 5'-[Gen 3]<sub>x3</sub>-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3',

(IV) 5'-[Gen 1]<sub>x1</sub>-[Gen 2]<sub>x2</sub>-[Gen 3]<sub>x3</sub>-[Gen 4]<sub>x4</sub>-3', y

25 Una combinación de las mismas,

En las que:

- "Gen 1" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE;

- "Gen 2" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferente del gen 1;

30 - "Gen 3" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferentes de los genes 1 y 2;

- "Gen 4" significa un ácido nucleico seleccionado de un grupo que comprende ALS, ALD, BDH o NOXE pero diferente de los genes 1 a 3;

- "ALS" es un ácido nucleico que codifica una acetolactato sintasa;

35 - "ALD" es un ácido nucleico que codifica una acetolactato descarboxilasa;

- "BDH" es un ácido nucleico que codifica una butanodiol deshidrogenasa;

- "NOXE" es un ácido nucleico que codifica una NADH oxidasa;

- cada uno de "x1", "x2", "x3" y "x4", uno independientemente de los otros, representa un número entero que oscila de 0 a 50, preferiblemente de 0 a 20, y lo más preferiblemente uno, y

40 Con tal que dicha levadura recombinante comprenda al menos un ácido nucleico que codifica para cada uno de ALS, ALD, BDH y NOXE.

3. La levadura recombinante según la reivindicación 2, en la que la levadura recombinante dicha comprende al menos un constructo de ADN de fórmula (II), en la que "Gen 4" significa un ácido nucleico que codifica NADH oxidasa.

4. La levadura recombinante según la reivindicación 2 o 3, en la que la levadura recombinante dicha comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, constructo(s) de ADN de fórmula (IIa), idénticos o diferentes, en los que cada fórmula (IIa) tiene la siguiente fórmula:

5 (IIa) 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-Gen 1-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-Gen 1-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-Gen 2-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-Gen 3-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-Gen 4-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x4</sub>-3'

En la que:

- Gen 1, Gen 2, Gen 3 y Gen 4 son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, y "x1", "x2", "x3" y "x4" son como se definen en la reivindicación 2;
- "x5" representa un número entero igual a 0 o 1;
- 10 - "y1", "y2", "z1" y "z2", uno independientemente de los otros, representan un número entero igual a 0 o 1;
- cuando dicha levadura recombinante comprende al menos dos constructos de ADN de fórmula (IIa), entonces "x1" a "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" pueden ser idénticos o diferentes;
- "prom 1" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 1;
- "prom 2" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 2;
- 15 - "prom 3" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 3;
- "prom 4" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica el gen 4;
- "prom5" es una secuencia reguladora que controla la expresión del Gen 1, siendo dicho prom5 idéntico o diferente de prom1;
- 20 - "term1" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 1;
- "term2" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 2;
- "term3" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 3;
- 25 - "term4" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica el gen 4; y
- "term5" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión del Gen 1, siendo dicho term5 idéntico o diferente de term1.

30 5. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la levadura recombinante dicha comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, constructo(s) de ADN de fórmula (IIb), idénticos o diferentes, en los que cada fórmula (IIb) tiene la siguiente fórmula:

(IIb) 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-ALS-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-ALS-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-ALD-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-BDH-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-NOXE-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x4</sub>-3'

En la que:

- 35 - ALS, ALD, BDH y NOXE son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores; "x1", "x2", "x3" y "x4" son como se definen en la reivindicación 2; y "x5" e "y1", "y2", "z1" y "z2" son como se definen en la reivindicación 4;
- cuando dicha levadura recombinante comprende al menos dos constructos de ADN de fórmula (IIb), entonces "x1" a "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" pueden ser idénticos o diferentes;
- 40 - "prom 1" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa;
- "prom 2" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato descarboxilasa;
- 45 - "prom 3" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la butanodiol deshidrogenasa;

- "prom 4" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la NADH oxidasa;
- "prom5" es una secuencia reguladora que controla la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa, siendo dicha prom5 idéntica o diferente de prom1;
- 5 - "term1" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa;
- "term2" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato descarboxilasa;
- "term3" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la butanodiol deshidrogenasa;
- 10 - "term4" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la NADH oxidasa; y
- "term5" es una secuencia terminadora de la transcripción que termina la expresión de la secuencia que codifica la acetolactato sintasa, siendo dicho term5 idéntico o diferente del term1.

15 6. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la levadura recombinante comprende al menos dos constructos de ADN de fórmula (II), (IIa) o (IIb), con tal que todas las copias del ácido nucleico de NOXE estén situadas en uno solo de los al menos dos constructos de ADN de fórmula (II), (IIa) o (IIb).

7. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que la levadura recombinante dicha comprende al menos dos, preferiblemente estrictamente dos, constructos de ADN de las siguientes fórmulas (IIc) y (IId):

20 (IIc) 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-ALS-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-ALS-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-ALD-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-BDH-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-NOXE-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x6</sub>-3'; y

(IId) 5'-[(prom5)<sub>y1</sub>-ALS-term5]<sub>x5</sub>-[prom1-ALS-term1]<sub>x1</sub>-[prom2-ALD-term2]<sub>x2</sub>-[prom3-BDH-(term3)<sub>z1</sub>]<sub>x3</sub>-3' y 5'-[(prom4)<sub>y2</sub>-NOXE-(term4)<sub>z2</sub>]<sub>x7</sub>-3';

En las que:

25 - ALS, ALD, BDH y NOXE son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores; "prom1", "prom2", "prom3", "prom4", "prom5", "term1", "term2", "term3", "term4" y "term5" son como se definen en las reivindicaciones 4 a 5; "x1", "x2" y "x3" son como se definen en la reivindicación 2; y "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" son como se definen en la reivindicación 4;

- "x1" a "x3", "x5", "y1", "y2", "z1" y "z2" que son para cada una de las fórmulas (IIc) y (IId) idénticos o diferentes; y

30 - "x6" y "x7" representa números enteros que oscilan de 0 a 50, preferiblemente 0 a 20, preferiblemente de 0 a 12, más particularmente de 2 a 5, preferiblemente de 3 a 4, y mejor aún igual a 3, con tal que uno entre "x6" y "x7" represente 0.

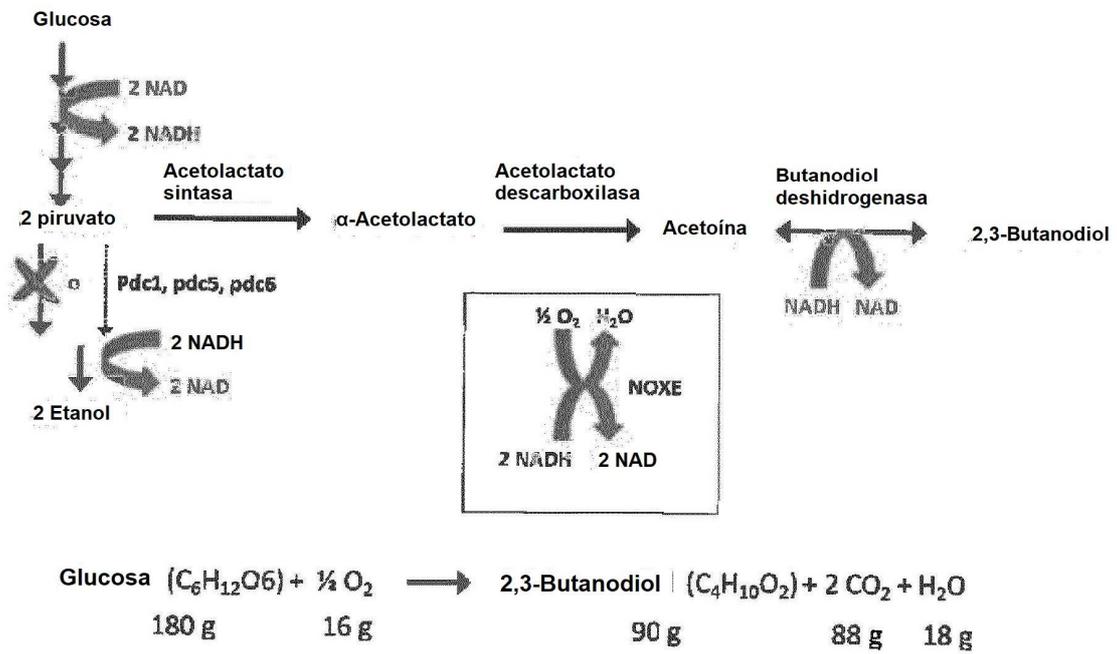
35 8. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) la acetolactato sintasa o ALS es/son ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 65%, preferiblemente al menos 80%, de identidad de ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO:1, 3 y 5.

40 9. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) la acetolactato descarboxilasa o ALD es/son ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 36%, preferiblemente al menos 80%, de identidad de ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO:7, 9 y 11.

10. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el (los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) la butanodiol deshidrogenasa o BDH es/son ácido(s) nucleico(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 63%, preferiblemente al menos 80% de identidad de ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO: 13, 15, 17 y 19.

45 11. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que cada uno de los ácidos nucleicos que codifican acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa, butanodiol deshidrogenasa, y NADH oxidasa está bajo el control de un promotor, idéntico o diferente, caracterizándose dichos promotores por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 80% de identidad de ácido nucleico con las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO:29 a 39, 49 y 50.

- 5 12. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que cada uno de los ácidos nucleicos que codifican acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa, butanodiol deshidrogenasa, y NADH oxidasa está bajo el control de un terminador de transcripción, idéntico o diferente, caracterizándose dichos terminadores de transcripción por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en secuencias que tienen al menos 80% de identidad de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:40 a 48.
13. La levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una o más copias de unos ácidos nucleicos que codifican una NADH oxidasa o NOXE seleccionada del grupo que comprende *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis*, y una mezcla de los mismos.
- 10 14. El uso de una levadura recombinante como se define según las reivindicaciones 1 a 13, para la producción de 2,3-butanodiol (BDO) y/o derivados directos del mismo, seleccionándose en particular dichos derivados directos de 2,3-butanodiol (BDO) del grupo que consiste en butanodieno (BDE), metiletilcetona (MEK) o una mezcla de los mismos.
15. El método para producir 2,3-butanodiol (BDO), comprendiendo dicho método las etapas de:
- 15 (a) cultivar una levadura recombinante tal como se define según las reivindicaciones 1 a 13 en un medio de cultivo apropiado; y
- (c) recuperar el 2,3-butanodiol (BDO).
16. El método según la reivindicación anterior, en el que el medio de cultivo dicho comprende una fuente de carbono, preferiblemente seleccionada en un grupo que comprende glucosa y sacarosa.



**FIGURA 1**