

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 502**

51 Int. Cl.:

C12N 15/81

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2019** **PCT/US2019/020526**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2019** **WO19173204**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2019** **E 19711486 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023** **EP 3762499**

54 Título: **Reducción en la producción de acetato por levadura que sobreexpresa pab1**

30 Prioridad:

06.03.2018 US 201862639183 P

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

20.06.2024

73 Titular/es:

DANISCO US INC (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US

72 Inventor/es:

QI, MIN;
TEUNISSEN, PAULA JOHANNA MARIA y
ZHU, QUINN QUN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 973 502 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

Reducción en la producción de acetato por levadura que sobreexpresa pab1

5 **Campo técnico**

Las presentes composiciones y métodos se refieren a levadura modificada que sobreexpresa proteína de unión a poliadenilato (PAB1). La levadura produce una cantidad disminuida de acetato en comparación con sus células originales. Dicha levadura es particularmente útil para la producción a gran escala de etanol a partir de sustratos de almidón, donde el acetato es un subproducto indeseable.

Antecedentes

La producción de etanol basada en levaduras de primera generación convierte los glúcidos en etanol combustible. La producción anual de etanol combustible por levadura es de aproximadamente 90 mil millones de litros en todo el mundo (Gombert, A.K. y van Maris, A.J. (2015) Curr. Opin. Biotechnol. 33:81-86). Se estima que aproximadamente un 70 % del coste de la producción de etanol es la materia prima. Como el volumen de producción es tan grande, incluso pequeñas mejoras en el rendimiento tienen un impacto económico masivo en la industria.

La ruta de la fosfocetolasa (PKL) se ha genomanipulado en levaduras para aumentar la producción de etanol, como se describe en el documento WO2015148272 (Miasnikov *et al.*). Desafortunadamente, las cepas manipuladas también producen más acetato que la levadura original. El acetato no es un subproducto deseable, ya que tiene efectos negativos sobre el crecimiento y la fermentación de la levadura. Además, el acetato reduce el pH del agua que queda de la fermentación y la destilación, denominado fondaje, que típicamente se reutiliza para licuación de un lote posterior de sustrato. Como resultado, los productores de etanol deben ajustar el pH del fondaje (o licuado) o aumentar la cantidad de agua nueva usada para la licuación.

El documento US2014/273144A1 se refiere al uso de fosfocetolasa y fosfotransacetilasa para la producción de compuestos derivados de acetil-coenzima A.

Existe la necesidad de controlar la cantidad de acetato producido por la levadura, particularmente levadura manipulada que tiende a producir una cantidad aumentada de acetato.

Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Las presentes composiciones y métodos se refieren a levadura modificada que sobreexpresa el polipéptido PAB1 como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada**I. Definiciones**

Antes de describir la presente levadura y métodos en detalle, se definen los siguientes términos por motivos de claridad. A los términos no definidos se les debe conceder sus significados habituales como se usan en la técnica pertinente.

Como se usa en este documento, el término "alcohol" se refiere a un compuesto orgánico en que un grupo funcional hidroxilo (-OH) se une a un átomo de carbono saturado.

Como se usa en este documento, las expresiones "células de levadura", "cepas de levadura" o simplemente "levadura" se refieren a organismos de los filos Ascomycota y Basidiomycota. Levaduras ejemplares son levaduras de gemación del orden Saccharomycetales. Ejemplos particulares de levadura son *Saccharomyces* spp., incluyendo, aunque sin limitación, *S. cerevisiae*. Las levaduras incluyen organismos usados para la producción de alcohol combustible, así como organismos usados para la producción de alcohol potable, incluyendo cepas de levadura especializadas y patentadas usadas para preparar cervezas con sabores distintivos, vinos y otras bebidas fermentadas.

Como se usa en este documento, la expresión "células de levadura manipuladas", "células de levadura variantes", "células de levadura modificadas" o expresiones similares, se refieren a levaduras que incluyen modificaciones genéticas y características descritas en este documento. Las levaduras variantes/modificadas no incluyen levaduras de origen natural.

Como se usan en este documento, los términos "polipéptido" y "proteína" (y sus formas plurales respectivas) se usan indistintamente para referirse a polímeros de cualquier longitud que comprenden residuos aminoácidos ligados mediante enlaces peptídicos. En este documento se usan los códigos convencionales de una letra o tres letras para los residuos aminoácidos y todas las secuencias se presentan en la dirección del extremo N al extremo C. El polímero puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por elementos que no son aminoácidos. Las

expresiones también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Como se usa en este documento, se considera que proteínas funcional y/o estructuralmente similares son "proteínas relacionadas" u "homólogos". Dichas proteínas pueden derivar de organismos de diferentes géneros y/o especies, o diferentes clases de organismos (por ejemplo, bacterias y hongos), o diseñarse artificialmente. Las proteínas relacionadas también abarcan homólogos determinados por análisis de la secuencia primaria, determinados por análisis de la estructura secundaria o terciaria, o determinados por reactividad cruzada inmunológica, o determinados por sus funciones.

Como se usa en este documento, la expresión "proteína homóloga" se refiere a una proteína que tiene actividad y/o estructura similar a una proteína de referencia. No se pretende que los homólogos estén necesariamente relacionados evolutivamente. Por tanto, se pretende que la expresión abarque enzima o enzimas iguales, similares o correspondientes (es decir, en términos de estructura y función) obtenidas de diferentes organismos. En algunas realizaciones, es deseable identificar un homólogo que tenga una estructura cuaternaria, terciaria y/o primaria similar a la proteína de referencia. En algunas realizaciones, las proteínas homólogas inducen una o más respuestas inmunológicas similares a una proteína de referencia. En algunas realizaciones, proteínas homólogas se manipulan para que produzca enzimas con una o más actividades deseadas.

El grado de homología entre secuencias puede determinarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*, 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444; programas tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:387-95).

Por ejemplo, PILEUP es un programa útil para determinar niveles de homología de secuencias. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones por pares progresivas. También puede trazar un árbol que muestra las relaciones de agrupamientos usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (Feng y Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35:351-60). El método es similar al descrito por Higgins y Sharp ((1989) *CABIOS* 5: 151-53). Los parámetros útiles de PILEUP incluyen una carga por hueco por defecto de 3,00, una carga por longitud de hueco por defecto de 0,10 y huecos finales ponderados. Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul *et al.* ((1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10) y Karlin *et al.* ((1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-87). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1996) *Meth. Enzymol.* 266:460-80). Los parámetros "W", "T" y "X" determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, por ejemplo, Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M⁵, N⁻⁴ y una comparación de ambas hebras.

Como se usan en este documento, las expresiones "sustancialmente similar" y "sustancialmente idéntico", en el contexto de al menos dos ácidos nucleicos o polipéptidos, típicamente significa que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 70 % de identidad, al menos aproximadamente un 75 % de identidad, al menos aproximadamente un 80 % de identidad, al menos aproximadamente un 85 % de identidad, al menos aproximadamente un 90 % de identidad, al menos aproximadamente un 91 % de identidad, al menos aproximadamente un 92 % de identidad, al menos aproximadamente un 93 % de identidad, al menos aproximadamente un 94 % de identidad, al menos aproximadamente un 95 % de identidad, al menos aproximadamente un 96 % de identidad, al menos aproximadamente un 97 % de identidad, al menos aproximadamente un 98 % de identidad o incluso al menos aproximadamente un 99 % de identidad, o más, en comparación con la secuencia de referencia (es decir, natural). El porcentaje de identidad de secuencia se calcula usando el algoritmo CLUSTAL W con parámetros por defecto. Véase Thompson *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680. Los parámetros por defecto para el algoritmo CLUSTAL W son:

Penalización por apertura de hueco:	10,0
Penalización por extensión de hueco:	0,05
Matriz de ponderación de proteínas:	serie BLOSUM
Matriz de ponderación de ADN:	ILTB
% de retardo de secuencias divergentes:	40
Distancia de separación de hueco:	8
Carga por transiciones de ADN:	0,50

Lista de residuos hidrófilos:	GPSNDQEKR
Uso de matriz negativa:	INACTIVO
Alternancia de penalizaciones específicas de residuo:	ACTIVO
Alternancia de penalizaciones hidrófilas:	ACTIVO
Alternancia de penalizaciones por separación de hueco final	INACTIVO

Otra indicación de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido es reactivo de forma cruzada inmunológicamente con el segundo polipéptido. Típicamente, los polipéptidos que difieren en sustituciones aminoácidas conservativas son reactivos de forma cruzada inmunológicamente. Por tanto, un polipéptido se sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solamente en una sustitución conservativa. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticos es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas (por ejemplo, en un intervalo de rigurosidad de media a alta).

Como se usa en este documento, el término "gen" es sinónimo del término "alelo" en referencia a un ácido nucleico que codifica y dirige la expresión de una proteína o ARN. Las formas vegetativas de hongos filamentosos en general son haploides, por lo tanto, una sola copia de un gen especificado (es decir, un solo alelo) es suficiente para conferir un fenotipo especificado. El término "alelo" en general se prefiere cuando un organismo contiene más de un gen similar, en cuyo caso cada diferente gen similar se denomina "alelo" distintivo.

Como se usa en este documento, expresión "constitutiva" se refiere a la producción de un polipéptido codificado por un gen particular en esencialmente todas las condiciones de crecimiento típicas, en oposición a la expresión "condicionada", que requiere la presencia de un sustrato, temperatura o similar particular para inducir o activar la expresión.

Como se usa en este documento, la expresión "expresar un polipéptido" y expresiones similares se refieren al proceso celular de producir un polipéptido usando la maquinaria de traducción (por ejemplo, ribosomas) de la célula.

Como se usa en este documento, "sobrexpresar un polipéptido", "aumentar la expresión de un polipéptido" y expresiones similares, se refieren a expresar un polipéptido a niveles mayores de los normales en comparación con los observados con células originales o "naturales" que no incluyen una modificación genética específica.

Como se usa en este documento, un "casete de expresión" se refiere a un fragmento de ADN que incluye un promotor, una región codificante de aminoácidos y un terminador (es decir, promotor: región codificante de aminoácidos: terminador) y otra secuencia de ácido nucleico necesaria para permitir que el polipéptido codificado se produzca en una célula. Los casetes de expresión pueden ser exógenos (es decir, introducidos en una célula) o endógenos (es decir, existentes en una célula).

Como se usan en este documento, los términos "fusionado" y "fusión" con respecto a dos fragmentos de ADN, tal como un promotor y la región codificante de un polipéptido se refieren a un enlace físico que provoca que los dos fragmentos de ADN sean una sola molécula.

Como se usa en este documento, los términos "natural" y "sin mutaciones" se usan indistintamente y se refieren a genes, proteínas o cepas encontrados en la naturaleza, o que no se han modificado intencionadamente para el aprovechamiento de la levadura descrita en la presente.

Como se usa en este documento, la expresión "proteína de interés" se refiere a un polipéptido que se desea expresar en la levadura modificada. Dicha proteína puede ser una enzima, una proteína de unión a sustrato, una proteína activa en superficie, una proteína estructural, un marcador de selección, un transductor de señales, un receptor, un transportador, un factor de transcripción, un factor de traducción, un cofactor o similares, y puede expresarse. La proteína de interés está codificada por un gen endógeno o un gen heterólogo (es decir, "gen de interés") con respecto a la cepa original. La proteína de interés puede expresarse de forma intracelular o como una proteína secretada.

Como se usa en este documento, "alteración de un gen" se refiere ampliamente a cualquier manipulación genética o química, es decir, mutación, que evita sustancialmente que una célula produzca un producto génico funcional, por ejemplo, una proteína, en una célula hospedadora. Métodos ejemplares de alteración incluyen eliminación completa o parcial de cualquier parte de un gen, incluyendo una secuencia codificante de polipéptido, un promotor, un potenciador u otro elemento regulador, o mutagénesis de los mismos, donde la mutagénesis abarca sustituciones, inserciones, eliminaciones, inversiones y combinaciones y variaciones, de los mismos, cualquiera de dichas mutaciones evita sustancialmente la producción de un producto génico funcional. Un gen también puede alterarse usando CRISPR, iARN, antisentido o cualquier otro método que anule la expresión génica. Un gen puede alterarse por eliminación o manipulación genética de elementos de control no adyacentes. Como se usa en este documento, "eliminación de un

gen" se refiere a su retirada del genoma de una célula hospedadora. Cuando un gen incluye elementos de control (por ejemplo, elementos potenciadores) que no están ubicados inmediatamente adyacentes a la secuencia codificante de un gen, la eliminación de un gen se refiere a la eliminación de la secuencia codificante, y opcionalmente elementos potenciadores adyacentes, incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo, secuencias promotoras y/o terminadoras, pero no requiere la eliminación de elementos de control no adyacentes. La eliminación de un gen también se refiere a la eliminación de una parte de la secuencia codificante, o una parte del promotor inmediatamente o no inmediatamente adyacente a la secuencia codificante, donde no hay actividad funcional del gen de interés encontrado en la célula manipulada.

Como se usa en este documento, las expresiones "manipulación genética" y "alteración genética" se usan indistintamente y se refieren a la alteración/cambio de una secuencia de ácido nucleico. La alteración puede incluir, aunque sin limitación, una sustitución, eliminación, inserción o modificación química de al menos un ácido nucleico en la secuencia de ácido nucleico.

Como se usa en este documento, un "polipéptido/proteína funcional" es una proteína que posee una actividad, tal como una actividad enzimática, una actividad de unión, una propiedad activa en superficie, un transductor de señales, un receptor, un transportador, un factor de transcripción, un factor de traducción, un cofactor o similares, y que no se ha mutagenizado, truncado o modificado de otro modo para anular o reducir esa actividad. Los polipéptidos funcionales pueden ser termoestables o termoinestables, según se especifique.

Como se usa en este documento, "un gen funcional" es un gen que puede usarse por los componentes celulares para producir un producto génico activo, típicamente una proteína. Los genes funcionales son la antítesis de los genes alterados, que se modifican de modo que no puedan usarse por los componentes celulares para producir un producto génico activo, o tienen una capacidad reducida de usarse por los componentes celulares para producir un producto génico activo.

Como se usa en este documento, las células de levadura se han "modificado para evitar la producción de una proteína especificada" si se han alterado genética o químicamente para evitar la producción de una proteína/polipéptido funcional que presenta una actividad característica de la proteína natural. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, eliminación o alteración del gen que codifica la proteína (como se describe en este documento), modificación del gen de modo que el polipéptido codificado carezca de la actividad mencionada anteriormente, modificación del gen para influir en el proceso postraducciona l o estabilidad, y combinaciones de los mismos.

Como se usa en este documento, "atenuación de una ruta" o "atenuación del flujo a través de una ruta", es decir, una ruta bioquímica, se refiere ampliamente a cualquier manipulación genética o química que reduzca o detenga completamente el flujo de sustratos bioquímicos o intermedios a través de una ruta metabólica. La atenuación de una ruta puede conseguirse mediante una diversidad de métodos bien conocidos. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación: eliminación completa o parcial de uno o más genes, remplazo de alelos naturales de estos genes con formas mutantes que codifican enzimas con actividad catalítica reducida o valores de Km aumentados, modificación de los promotores u otros elementos reguladores que controlan la expresión de uno o más genes, manipulación de las enzimas o el ARNm que codifica estas enzimas para una estabilidad disminuida, dirección incorrecta de las enzimas a compartimentos celulares donde hay menos probabilidad de que interactúen con el sustrato y los intermedios, el uso de ARN interferente y similares.

Como se usa en este documento, "fermentación aeróbica" se refiere al crecimiento en presencia de oxígenos.

Como se usa en este documento, "fermentación anaeróbica" se refiere al crecimiento en ausencia de oxígeno.

Como se usa en este documento, la expresión "fin de la fermentación" se refiere a la fase de fermentación cuando la ventaja económica de continuar la fermentación para producir una pequeña cantidad de alcohol adicional se excede por el coste de continuar la fermentación en términos de costes fijos y variables. En un sentido más general, "fin de la fermentación" se refiere al punto donde una fermentación ya no producirá una cantidad significativa de alcohol adicional, es decir, no más de aproximadamente un 1 % de alcohol adicional, o no queda más sustrato para producción de más alcohol.

Como se usa en este documento, la expresión "flujo de carbono" se refiere a la tasa de recambio de moléculas de carbono a través de una ruta metabólica. El flujo de carbono se regula por enzimas implicadas en rutas metabólicas, tal como la ruta para el metabolismo de la glucosa y la ruta para el metabolismo de la maltosa.

Como se usan en este documento, los artículos singulares "uno/o", "una" y "el/la" abarcan los referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Las siguientes abreviaturas/acró nimos tienen los siguientes significados salvo que se indique lo contrario:

EC comisión de enzimas

PKL fosfocetolasa

	PTA	fosfotransacetilasa
5	AADH	acetaldehído deshidrogenasas
	ADH	alcohol deshidrogenasa
	EtOH	etanol
10	AA	α -amilasa
	GA	glucoamilasa
15	°C	grados Celsius
	pb	pares de bases
	ADN	ácido desoxirribonucleico
20	ds o DS	sólidos secos
	g o gm	gramo
25	g/l	gramos por litro
	H ₂ O	agua
	HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento
30	hr o h	hora
	kg	kilogramo
35	M	molar
	mg	miligramo
	mL o ml	mililitro
40	min	minuto
	mM	milimolar
45	N	normal
	Nm	nanómetro
	PAB1	proteína de unión a poliadenilato
50	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	ppm	partes por millón
55	Δ	se refiere a una eliminación
	μ g	microgramo
	μ L y μ l	microlitro
60	μ M	micromolar

II. Células de levadura modificadas que tienen expresión aumentada de PAB1

65 Se describen levaduras modificadas y métodos que tienen una alteración genética que provoca la producción de cantidades aumentadas de polipéptidos PAB1 en comparación con las correspondientes células originales (es decir, idénticas por lo demás). PAB1 es la proteína principal de unión a poli(A) en levaduras. Es una proteína multifuncional

de aproximadamente 577 residuos aminoacídicos que media muchas funciones celulares asociadas con la cola 3'-poli(A) de los ARN mensajeros (véase, por ejemplo, Brune, C. *et al.* (2005) RNA. 11:517-531). La sobreexpresión de PAB1 aumentaba la tolerancia a las agresiones de las levaduras manipuladas (Martani, F. *et al.*, (2015), Sci. Rep. 5: 18318; doi: 10.1038/srep18318). Hasta ahora no se ha hecho una asociación entre la expresión de PAB1 y la reducción de acetato en levaduras manipuladas.

Los solicitantes han descubierto que las células de levadura que sobreexpresan polipéptidos PAB1 producen una cantidad disminuida de acetato en comparación con células originales idénticas por lo demás. El acetato disminuido es deseable ya que el acetato afecta de forma adversa al crecimiento y fermentación de las levaduras y adicionalmente provoca fondaje que tienen un pH menor que el deseable, lo que requiere ajuste del pH o el uso de más agua nueva para diluir el fondaje.

En algunas realizaciones, el aumento en la cantidad de polipéptidos PAB1 producida por las células modificadas es un aumento de al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 70 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos un 200 %, al menos un 500 %, al menos un 1000 % o más, especialmente en la fase tardía de fermentación, en comparación con la cantidad de polipéptidos PAB1 producida por células originales cultivadas en las mismas condiciones.

En algunas realizaciones, el aumento en la cantidad de polipéptidos PAB1 producida por las células modificadas es al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces o más, en comparación con la cantidad de polipéptidos PAB1 producida por células originales cultivadas en las mismas condiciones.

En algunas realizaciones, el aumento en la potencia del promotor usado para controlar la expresión de los polipéptidos PAB1 producida por las células modificadas es al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 13 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces o más, en comparación con la potencia del promotor natural que controla la expresión de PAB1, en función de la cantidad de ARNm producido. Los datos de RNAseq (véase, por ejemplo, Wang, Z. *et al.* (2009) Nature Rev. Gen. 10:57-63) indican que el promotor EFB1 usado para el casete de expresión de PAB1 ejemplificado es aproximadamente 13 veces más fuerte que el promotor normal de PAB1.

En algunas realizaciones, la disminución en la producción de acetato por las células modificadas es una disminución de al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 % o al menos un 50 % o más, en comparación con la cantidad de acetato producida por células originales cultivadas en las mismas condiciones.

Preferiblemente, la expresión aumentada de PAB1 se consigue mediante manipulación genética usando técnicas de biología molecular específicas de secuencia, en oposición a la mutagénesis química, que en general no está dirigida a secuencias específicas de ácido nucleico. Sin embargo, la mutagénesis química no se excluye como método para preparar células de levadura modificadas.

En algunas realizaciones, las presentes composiciones y métodos implican introducir en células de levadura un ácido nucleico que puede dirigir la sobreexpresión, o expresión aumentada, de un polipéptido PAB1. Métodos particulares incluyen, aunque sin limitación, (i) introducir un casete de expresión exógeno para producir el polipéptido en una célula hospedadora, opcionalmente además de un casete de expresión endógeno, (ii) sustituir un casete de expresión exógeno con un casete endógeno que permita la producción de una cantidad aumentada del polipéptido, (iii) modificar el promotor de un casete de expresión endógeno para aumentar la expresión, (iv) aumentar el número de copias de casetes iguales o diferentes para la sobreexpresión de PAB1, y/o (v) modificar cualquier aspecto de la célula hospedadora para aumentar la semivida del polipéptido en la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, la célula original que ya está modificada incluye un gen de interés, tal como un gen que codifica un marcador de selección, enzima que procesa carbohidratos u otro polipéptido. En algunas realizaciones, se introduce posteriormente un gen de interés en las células modificadas.

En algunas realizaciones, la célula original que ya está modificada incluye una ruta de interés manipulada, tal como una ruta PKL para aumentar la producción de etanol, o cualquier otra ruta para aumentar la producción de alcohol.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido PAB1 de *S. cerevisiae* ejemplificado se muestra, a continuación, como SEQ ID NO: 1:

MADITDKTAEQLENLNIQDDQKQAATGSESQSVENSSASLYVGDLEPSVSEAHLYDIFSPIG
SVSSIRVCRDAITKTS LGYAYVNFNDHEAGRKAIEQLNYTPIKGRLCRIMWSQRDP SLRKKG

SGNIFIKNLHPDIDNKALYDTFSVFGDILSSKIATDENGKSKGFGFVHFEEEGAAKEAIDAL
 NGMLLNGQEIIYVAPHLRKRERDSQLEETKAHYTNLYVKNINSETTDEQFQELFAKFGPIVSA
 SLEKDADGKLKGFGFVNYEKHEDAVKAVEALNDSELNGEKLIVGRAQKKNERMHVLKKQYEA
 YRLEKMAKYQGVNLFVKNLDDSVDEKLEEEFAPYGTITSKVMRTENGKSKGFGFVCFSTP
 EEATKAITEKNQQIVAGKPLYVAIAQRKDVRRSQLAQQIQARNQMRYYQQAATAAAAAAAGMP
 GQFMPPMFYGVMPPRGVPFNGPNPQQMNPMMGMPKNGMPPQFRNGPVYGVPPQGGFPRNAND
 NNQFYQQKQRQALGEQLYKKVSAKTSNEEAAGKITGMILDLPQEVFPLESDELFEQHYKE
 ASAAYESFKKEQEQQTEQA

5 La base de datos del NCBI incluye más de 100 entradas para polipéptidos PAB1 de *S. cerevisiae*. No se espera que las variaciones naturales en la secuencia de aminoácidos afecten a su función. Además, en función de dichos datos de BLAST y Clustal W, es evidente que el polipéptido PAB1 de *S. cerevisiae* ejemplificado comparte un alto grado de identidad de secuencia con polipéptidos de otros organismos, y se espera que la sobreexpresión de proteínas funcional y/o estructuralmente similares, proteínas homólogas y/o proteínas sustancialmente similares o idénticas, produzca resultados beneficiosos similares.

10 En realizaciones particulares de las presentes composiciones y métodos, la secuencia de aminoácidos del polipéptido PAB1 que se sobreexpresa en células de levadura modificadas tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o incluso al menos aproximadamente un 99 % de identidad, con SEQ ID NO: 1.

20 **III. Células de levadura modificadas que tienen expresión aumentada de PAB1 en combinación con genes de una ruta PKL exógena**

La expresión aumentada de PAB1 puede combinarse con la expresión de genes de la ruta PKL para reducir la producción de cantidades elevadas de acetato, que está asociada con la introducción de una ruta PKL exógena en lavaduras.

25 Se han descrito previamente células de levadura manipuladas que tienen una ruta PKL heteróloga en el documento WO2015148272 (Miasnikov *et al.*). Estas células expresan fosfocetolasa (PKL), fosfotransacetilasa (PTA) y acetil deshidrogenasa acetilante (AADH) heterólogas, opcionalmente con otras enzimas, dirigir el flujo de carbono lejos de la ruta de glicerol y hacia la síntesis de acetil-CoA, que después se convierte en etanol. Dichas células modificadas tienen capacidad de producción aumentada de etanol en un proceso de fermentación en comparación con células de levadura originales idénticas por lo demás.

IV. Combinación de producción aumentada de PAB1 activa con otras mutaciones que afectan a la producción de alcohol

35 En algunas realizaciones, además de expresar cantidades aumentadas de polipéptidos PAB1 activos, opcionalmente en combinación con introducir una ruta PKL exógena, las presentes células de levadura modificadas incluyen modificaciones adicionales que afectan a la producción de etanol.

40 Las células modificadas pueden incluir además mutaciones que provocan la atenuación de la ruta natural de biosíntesis de glicerol y/o la ruta de reutilización de glicerol, que se sabe que aumentan la producción de alcohol. Los métodos para la atenuación de la ruta de biosíntesis de glicerol en levaduras son conocidos e incluyen reducción o eliminación de la actividad de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) dependiente de NAD o la glicerol fosfato fosfatasa (GPP) endógena, por ejemplo, al alterar uno o más de los genes *GPD1*, *GPD2*, *GPP1* y/o *GPP2*. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 9.175.270 (Elke *et al.*), 8.795.998 (Pronk *et al.*) y 8.956.851 (Argyros *et al.*). Métodos para potenciar la ruta de reutilización de glicerol por sobreexpresión de la glicerol deshidrogenasa (GCV1) y la dihidroxiacetona cinasa (DAK1) para convertir el glicerol en fosfato de dihidroxiacetona (Zhang *et al.*; J Ind Microbiol Biotechnol (2013) 40:1153-1160).

50 La levadura modificada puede presentar además actividad aumentada de la acetil-CoA sintasa (también denominada acetil-CoA ligasa) (EC 6.2.1.1) para aceptar (es decir, capturar) el acetato producido por hidrólisis química o enzimática de acetil-fosfato (o presente en el medio de cultivo de la levadura por cualquier otra razón) y lo convierte en Ac-CoA. Esto reduce parcialmente el efecto indeseable del acetato sobre el crecimiento de las células de levadura y puede contribuir además a una mejora en el rendimiento del alcohol. Aumentan la actividad acetil-CoA sintasa puede

conseguirse introduciendo un gen heterólogo de la acetil-CoA sintasa, aumentando la expresión de un gen endógeno de la acetil-CoA sintasa y similares.

En algunas realizaciones, las células modificadas pueden incluir además un gen heterólogo que codifica una proteína con actividad de la acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD⁺ y/o un gen heterólogo que codifica una piruvato-formiato liasa. La introducción de dichos genes en combinación con la atenuación de la ruta de glicerol se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 8.795.998 (Pronk *et al.*). En algunas realizaciones de las presentes composiciones y métodos, la levadura carece expresamente de uno o más genes heterólogos que codifican una acetaldehído deshidrogenasa acetilante, una piruvato-formiato liasa o ambas.

En algunas realizaciones, las presentes células de levadura modificadas además pueden sobreexpresar un polipéptido similar a transportador de glúcidos (STL1) para aumentar la captación de glicerol (véase, por ejemplo, Ferreira *et al.*, 2005; Dušková *et al.*, 2015 y el documento WO 2015023989 A1).

En algunas realizaciones, las presentes células de levadura modificadas incluyen además una ruta biosintética de butanol. En algunas realizaciones, la ruta biosintética de butanol es una ruta biosintética de isobutanol. En algunas realizaciones, la ruta biosintética de isobutanol comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que cataliza la conversión de un sustrato a producto seleccionado del grupo que consiste en: (a) piruvato en acetolactato; (b) acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato; (c) 2,3-dihidroxiisovalerato en 2-cetoisovalerato; (d) 2-cetoisovalerato en isobutiraldehído; y (e) isobutiraldehído en isobutanol. En algunas realizaciones, la ruta biosintética de isobutanol comprende polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen actividad acetolactato sintasa, cetoácido reductoisomerasa, dihidroxiácido deshidratasa, cetoisovalerato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa.

En algunas realizaciones, las células de levadura modificadas que comprende una ruta biosintética de butanol comprenden además una modificación en un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad piruvato descarboxilasa. En algunas realizaciones, las células de levadura comprenden una eliminación, mutación y/o sustitución en un polinucleótido endógeno que codifica un polipéptido que tiene actividad piruvato descarboxilasa. En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad piruvato descarboxilasa se selecciona del grupo que consiste en: PDC1, PDC5, PDC6 y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células de levadura comprenden además una eliminación, mutación y/o sustitución en uno o más polinucleótidos endógenos que codifican FRA2, ALD6, ADH1, GPD2, BDH1 e YMR226C.

V. Combinación de expresión aumentada de PAB1 con otras mutaciones beneficiosas

En algunas realizaciones, además de la expresión aumentada de polipéptidos PAB1, opcionalmente en combinación con otras modificaciones genéticas que benefician la producción de alcohol, las presentes células de levadura modificadas incluyen además muchísimos genes adicionales de interés que codifican proteínas de interés. Pueden introducirse genes adicionales de interés antes, durante o después de las manipulaciones genéticas que provocan la producción aumentada de polipéptidos HAC1 activos. Las proteínas de interés incluyen marcadores de selección, enzimas que procesan carbohidratos, y otros polipéptidos comercialmente relevantes incluyendo, aunque sin limitación, una enzima seleccionada del grupo que consiste en una deshidrogenasa, una transcetolasa, una fosfocetolasa, una transladolasa, una epimerasa, una fitasa, una xilanas, una β -glucanasa, una fosfatasa, una proteasa, una α -amilasa, una β -amilasa, una glucoamilasa, una pululanasa, una isoamilasa, una celulasa, una trehalasa, una lipasa, una pectinasa, una poliesterasa, una cutinasa, una oxidasa, una transferasa, una reductasa, una hemicelulasa, una mananasa, una esterasa, una isomerasa, una pectinasa, una lactasa, una peroxidasa y una lacasa. Las proteínas de interés pueden secretarse, glucosilarse y modificarse de otro modo.

VI. Uso de la levadura modificada para producción aumentada de alcohol

Las presentes composiciones y métodos incluyen métodos para aumentar la producción de alcohol y/o reducir la producción de glicerol, en reacciones de fermentación. Dichos métodos no se limitan a un proceso de fermentación particular. Se espera que la presente levadura manipulada sea un remplazo "instantáneo" para la levadura de costumbre en cualquier instalación de fermentación de alcohol. Aunque se pretende principalmente para la producción de alcohol combustible, la presente levadura también puede usarse para la producción de alcohol potable, incluyendo vino y cerveza.

VII. Células de levadura adecuadas para modificación

Las levaduras son microorganismos eucarióticos unicelulares clasificados como miembros del reino de los hongos e incluyen organismos de los filos Ascomycota y Basidiomycota. Las levaduras que pueden usarse para la producción de alcohol incluyen, aunque sin limitación, *Saccharomyces* spp., incluyendo *S. cerevisiae*, así como *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Schizosaccharomyces* spp. Numerosas cepas de levadura están disponibles en el mercado, muchas de ellas se han seleccionado o genomanipulado para características deseadas, tales como alta producción de alcohol, tasa de crecimiento rápida y similares. Algunas levaduras se han genomanipulado para producir enzimas heterólogas, tales como glucoamilasa o α -amilasa.

VII. Sustratos y productos

La producción de alcohol a partir de varios sustratos glucídicos incluyendo, aunque sin limitación, almidón de maíz, caña de azúcar, mandioca y melazas, es bien conocida, como lo son las innumerables variaciones y mejoras a las condiciones enzimáticas y químicas y procesos mecánicos. Se cree que las presentes composiciones y métodos son completamente compatibles con dichos sustratos y condiciones.

Los productos de fermentación de alcohol incluyen compuesto orgánico que tiene un grupo funcional hidroxilo (-OH) unido a un átomo de carbono. Alcoholes ejemplares incluyen, aunque sin limitación, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, n-pentanol, 2-pentanol, isopentanol y alcoholes superiores. Los alcoholes combustibles más habitualmente preparados son etanol y butanol.

Estos y otros aspectos y realizaciones de las presentes cepas de levadura y métodos serán evidentes para los expertos en la materia en vista de la presente descripción. Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren además, pero sin limitar, las composiciones y métodos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Preparación de licuado:

El licuado (suspensión de purés de maíz) se preparó añadiendo 600 ppm de urea, 0,124 SAPU/g de ds FERMGEN™ 2,5x (proteasa fúngica ácida), 0,33 GAU/g de ds CS4 (una glucoamilasa variante de *Trichoderma*) y 1,46 SSCU/g de ds AKAA (α -amilasa de *Aspergillus kawachii*), ajustado a un pH de 4,8.

Ensayos en vial de suero:

Se inocularon 2 ml de YPD en placas de 24 pocillos con células de levadura y los cultivos se dejaron crecer durante una noche hasta una DO entre 25-30. Se transfirieron 5 ml de licuado (5,6 g) a viales de suero (Chemglass, n.º de catálogo CG-4904-01) y se añadió levadura a cada vial hasta una DO final de aproximadamente 0,3. Las tapas de los viales se instalaron y perforaron con aguja (BD, n.º de catálogo 305111) para la ventilación (para liberar el CO₂), después se incubaron a 32 °C con agitación a 200 RPM durante 55 horas.

Ensayo en AnKom:

Se añadieron 300 µl de cultivo durante una noche de levadura concentrada a cada uno de varios frascos ANKOM llenos de 50 g de licuado preparado (véase anteriormente) hasta una DO final de 0,3. Los frascos entonces se incubaron a 32 °C con agitación a 150 RPM durante 55 horas.

Análisis de HPLC:

Se recogieron muestras de los cultivos de viales de suero y ensayos en AnKom en tubos Eppendorf por centrifugación durante 12 minutos a 14 000 RPM. Los sobrenadantes se filtraron usando filtros de PTFE de 0,2 µm y después se usaron para análisis de HPLC (Agilent Technologies serie 1200) con las siguientes condiciones: columnas Bio-Rad Aminex HPX-87H, temperatura de procesamiento de 55 °C, 0,6 ml/min de flujo isocrático de H₂SO₄ 0,01 N, 2,5 µl de volumen de inyección. Se usaron patrones de calibración para la cuantificación de acetato, etanol, glicerol, glucosa y otras moléculas. Todos los valores se presentan en g/l.

Ejemplo 2

Preparación de un casete de expresión de PAB1

El gen de PAB1 de *Saccharomyces cerevisiae* se optimizó en los codones y se sintetizó para generar el gen artificial, "PAB1s". El promotor EFB1 (locus YAL003W; SEQ ID NO: 3) y el terminador TPI (locus YDR050C; SEQ ID NO: 4) se unieron de forma funcional a la secuencia codificante para generar el casete de expresión EFB1Pro::PAB1s::Tpi1Ter. Este casete de expresión se introdujo en la región en dirección 5' del locus AAP1 (YHR047C) de (i) FERMAX™ Gold (Martrex Inc., Minnesota, EE. UU.; en este documento abreviado, "FG"), una levadura de fermentación bien conocida usada en la industria de etanol a partir de cereales, o (ii) FG-PKR, levadura FG manipulada que tiene una ruta heteróloga de fosfocetolasa (PKL) que implica la expresión de fosfocetolasa (PKL), fosfotransacetilasa (PTA) y acetil deshidrogenasa acetilante (AADH) como se describe en el documento WO2015148272 (Miasnikov *et al.*) usando tecnología de CRISPR Cas9. La inserción esperada del casete de expresión de PAB1 en las dos cepas originales se confirmó por PCR.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido PAB1 se muestra a continuación, como SEQ ID NO: 1:

MADITDKTAEQLENLNIQDDQKQAATGSESQSVENSSASLYVGDLEPSVSEAHLYDIFSPIG
SVSSIRVCRDAITKTS LGYAYVNFNDHEAGRKAIEQLNYTPIKGRLCRIMWSQRDPSLRKKG
SGNIFIKNLHPDIDNKALYDTFSVFGDILSSKIATDENGKSKGFGFVHFEEEGAAKEAIDAL
NGMLLNGQEIIYVAPHL SRKERDSQLEETKAHYTNLYVKNINSETTDEQFQELFAKFGPIVSA
SLEKDADGKLKGFGFVNYEKHEDAVKAVEALNDSELNGEKLYVGRAQKKNERMHVLKKQYEA
YRLEKMAKYQG VNLFVKNLDDSVDEKLEEEFAPYGTITS AKVMRTENGKSKGFGFVCFSTP
EEATKAITEKNQQIVAGKPLYVAIAQRKDVRRSQLAQQIQARNQMR YQQATAAAAAAAGMP
GQFMPPMFYGVMP PRGVPFNGPNPQQMNPMMGMPKNGMPPQFRNGPVYGVPPQGGFPRNAND
NNQFYQQQRQALGEQLYKKVSAKTSNEEAAGKITGMILDLP PQEVFP LLESDELFEQHYKE
ASAAYESFKKEQEQQTEQA

La región codificante de PAB1 del gen PAB1s se muestra a continuación como SEQ ID NO: 2:

ATGGCTGACATCACCGACAAGACTGCCGAACAATTGGAAAAC TTGAACATTCAAGACGATCA
GAAGCAAGCTGCCACTGGTTCCGAATCTCAATCCGTCGAAAAC TCTCCGCTTCTTTGTACG
TTGGTGACTTAGAACCATCTGTCTCCGAAGCTCACTTGTACGACATCTTCTCTCCAATCGGT

TCCGTCCTCTCCATCAGAGTTTGTCTGATGCTATCACCAAGACCAGCTTGGGTTACGCTTA
 CGTCAACTTTAACGACCATGAAGCTGGCAGAAAGGCTATCGAACAATTGAACTACACTCCAA
 TCAAGGGTAGACTATGTAGAATCATGTGGTCTCAACGTGATCCATCCTTGAGAAAGAAAGGT
 TCTGGCAACATCTTCATCAAGAACTTGCATCCAGACATTGACAACAAGGCTTTGTACGATAC
 TTTCAGTGTCTTTGGTGACATCTTATCTTCCAAGATTGCTACCGACGAAAACGGAAAGTCCA
 AGGGTTTTGGCTTTGTTCACTTCGAAGAGGAAGGTGCTGCCAAGGAAGCTATCGATGCTTTG
 AATGGTATGCTATTGAACGGTCAAGAAATCTACGTTGCTCCTCACTTGTCAGAAAGGAACG
 TGACTCTCAATTGGAAGAGACCAAGGCTCACTACACCAACTTGTACGTCAAGAATATCAACT
 CCGAAACTACCGACGAACAATTTCAAGAATTGTTTGCCAAGTTTGGTCCAATTGTTTCTGCT
 TCCTTGGAAGAGGATGCCGACGGCAAGTTGAAGGGTTTCGGTTTCGTCAACTACGAAAAGCA
 CGAAGACGCTGTCAAGGCTGTGGAAGCCTTGAACGATTCCGAACATAATGGCGAAAAGTTGT
 ACGTTGGTAGAGCACAGAAAAAGAACGAACGTATGCACGTCTTGAAGAAACAATACGAAGCT
 TACAGATTGGAAAAGATGGCCAAGTACCAAGGTGTTAATTTGTTTCGTCAAGAACTTGGACGA
 TTCTGTGATGACGAAAAGTTGGAAGAGGAATTTGCTCCATACGGTACTATCACCTCTGCCA
 AGGTCATGAGAACCGAAAACGGTAAGTCCAAGGGTTTTGGCTTCGTCTGTTTCTCTACTCCA
 GAGGAAGCTACCAAGGCTATCACCGAAAAGAATCAACAGATTGTTGCTGGCAAGCCATTGTA
 CGTTGCCATTGCTCAAAGAAAGGACGTCAGACGTTCTCAACTAGCTCAACAGATCCAAGCCA
 GAAACCAAATGAGATACCAACAGGCTACTGCTGCCGCTGCAGCTGCCGCTGCAGGTATGCCA
 GGTCAATTCATGCCTCCAATGTTTTACGGTGTCTATGCCTCCAAGAGGTGTTCCATTCAACGG
 TCCAAACCCTCAACAGATGAATCCAATGGGTGGAATGCCAAAGAACGGTATGCCTCCACAAT
 TCAGAAACGGTCCAGTCTACGGTGTCCCTCCACAAGGTGGCTTTCCAAGAAACGCTAACGAC
 AACAATCAATTCTACCAACAGAAGCAAAGACAAGCTTTGGGTGAACAATTGTACAAGAAAGT
 TTCTGCCAAGACTTCCAACGAAGAAGCTGCAGGCAAGATCACTGGTATGATCTTGGATTTAC
 CACCTCAAGAAGTCTTCCCACTATTGGAATCCGACGAATTGTTTGAACAACACTACAAGGAG
 GCTTCTGCTGCCTACGAATCTTTCAAAAAGGAACAAGAGCAACAGACTGAACAAGCCTAA

La región promotora EFB1 usada para la sobreexpresión de PAB1s se muestra a continuación como SEQ ID NO: 3:

TATGTTGTACCTAAATCAATACCGACAGCTTTTGACATATTATCTGTTATTTACTTGAATTT
 TTGTTTCTTGTAATACTTGATTACTTTTCTTTTGATGTGCTTATCTTACAAATAGAGAAAAT
 AAAACAACCTTAAGTAAGAATTGGGAAACGAACTACAACCTCAATCCCTTCTCGAAGATACAT
 CAATCCACCCCTTATATAACCTTGAAGTCCTCGAAACGATCAGCTAATCTAAATGGCCCCC
 TTCTTTTTGGGTTCTTTCTCTCCCTCTTGCCGCCGATGGAACGTTCTGGAAAAAGAAGAATA
 ATTTAATTACTTTCTCAACTAAAATCTGGAGAAAAACGCAAATGACAGCTTCTAAACGTTT
 CGTGTGCTTTCTTTCTAGAATGTTCTGGAAAGTTTACAACAATCCACAAGAACGAAAATGCC
 GTTGACAATGATGAAACCATCATCCACACACCGCGCACACGTGCTTTATTTCTTTTTCTGAA
 TTTTTTTTTTCCGCCATTTTCAACCAAGGAAATTTTTTTTTCTTAGGGCTCAGAACCTGCAGG
 TGAAGAAGCGCTTTAGAAATCAAAGCACAACGCAACAATTTGTGACAACCGAGCCTTTGAA
 GAAAAAATTTTTCACATTGTGCCTCTAAATAAATAGTTTAAGGTTATCTACCCACTATATT
 TAGTTGGTCTTTTTTTTTTCTTCTACTCTTTATCTTTTTTACCTCATGCTTTCTACCTTTC
 AGCACTGAAGAGTCCAACCGAATATATACACACATA

La región terminadora Tpi1 usada para la sobreexpresión de PAB1s se muestra a continuación como SEQ ID NO: 4:

```

ATTAAATATAATTATATAAAAAATATTATCTTCTTTTCTTTATATCTAGTGTTATGTAA
AATAAATTGATGACTACGGAAAGCTTTTTTATATTGTTTCTTTTTCATTCTGAGCCACTTAA
ATTCGTGAATGTTCTTGTAAGGGACGGTAGATTTACAAGTGATACAACAAAAAGCAAGGCG
CTTTTCTAATAAAAAGAAGAAAAGCATTTTACCAATTGAACACCTCTATATCAACGAAGAAT
ATTACTTTGTCTCTAAATCCTTGTAATAATGTGTACGATCTCTATATGGGTTACTCATAAGTG
TACCGAAGACTGCATTGAAAGTTTATGTTTTTTCCTGGAGGCGTCATTTTCGCGTTGAGAA
GATGTTCTTATCCAAATTTCAA

```

Ejemplo 3

Producción de alcohol usando levadura que sobreexpresa PAB1

- 5 Se ensayaron cepas que sobreexpresan PAB1 en un ensayo en vial pequeño, que contenía 5,6 g de licuado, y después en un ensayo en Ankom, que contenía 50 g de licuado, como se describe en el ejemplo 1. Se realizaron fermentaciones a 32 °C durante 55 horas. Las muestras de fin de la fermentación se analizaron por HPLC. Los resultados se resumen en las tablas 1 y 2.

10 **Tabla 1.** Resultados de HPLC de ensayos en vial pequeño

Rasgos de la cepa	Glicerol (g/l)	Acetato (g/l)	Glucosa (g/l)	Etanol (g/l)	Reducción de acetato (%)
FG	13,767	1,275	0,291	143,839	-0-
FG-PAB1	14,707	1,063	0,173	143,039	16,6 %
FG-PKL	12,811	1,744	0,583	145,101	-0-
FG-PKL-PAB1	13,554	1,308	0,661	144,524	25,0 %

Tabla 2. Resultados de HPLC de un ensayo en Ankom

Rasgos de la cepa	Glucosa (g/l)	Glicerol (g/l)	Acetato (g/l)	Etanol (g/l)	Reducción de acetato (%)
FG	0,32	13,15	0,90	140,20	-0-
FG-PAB1	0,31	13,91	0,79	140,11	12,2 %
FG-PKL	0,61	11,94	1,42	141,45	-0-
FG-PKL-PAB1	0,71	12,69	1,06	140,33	25,4 %

- 20 La sobreexpresión de PAB1 provocó una disminución en la producción de acetato de aproximadamente un 12-17 % en levadura FG, que está reconocida como una levadura robusta de elevada producción de etanol para la industria de etanol combustible, aunque no sea un organismo genomanipulado. La sobreexpresión de PAB1 provocó una disminución de hasta casi dos veces como mucho en levadura FG manipulada para que tenga una ruta PKL exógena. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de PAB1 es beneficiosa para reducir el acetato, en general, pero
- 25 es particularmente beneficiosa para reducir la cantidad aumentada de acetato producida por levadura que tiene una ruta PKL.

REIVINDICACIONES

1. Células de levadura modificadas derivadas de células de levadura originales, comprendiendo las células modificadas una alteración genética que provoca que las células modificadas produzcan una cantidad aumentada de polipéptidos PAB1 en comparación con las células originales, en donde las células modificadas producen, durante la fermentación, una cantidad disminuida de acetato en comparación con la cantidad de acetato producida por las células originales en condiciones de fermentación idénticas y en donde las células modificadas comprenden además uno o más genes heterólogos de la ruta de fosfocetolasa, en donde la alteración genética comprende la introducción en las células originales de un ácido nucleico que puede dirigir la expresión de un polipéptido PAB1 hasta un nivel por encima del de la célula original cultivada en condiciones equivalentes.
2. Las células modificadas de la reivindicación 1, en donde la alteración genética comprende:
 - (a) introducir un casete de expresión exógeno para producir el polipéptido PAB1 en la célula hospedadora;
 - (b) modificar el promotor de un casete de expresión endógeno para aumentar la expresión del polipéptido PAB1; o
 - (c) aumentar el número de copias de casetes iguales o diferentes para la sobreexpresión de PAB1.
3. Las células modificadas de la reivindicación 1, en donde la alteración genética comprende la introducción de un casete de expresión para expresar un polipéptido PAB1.
4. Las células modificadas de la reivindicación 1, en donde los genes de la ruta de fosfocetolasa se seleccionan del grupo que consiste en fosfocetolasa, fosfotransacetilasa y acetil deshidrogenasa acetilante.
5. Las células modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la cantidad de aumento en la expresión del polipéptido PAB1 es al menos aproximadamente un 200 % en comparación con el nivel de expresión en las células originales cultivadas en condiciones equivalentes.
6. Las células modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la cantidad de aumento en la producción de ARNm que codifica el polipéptido PAB1 es al menos aproximadamente un 400 % en comparación con el nivel en las células originales cultivadas en condiciones equivalentes.
7. Las células modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las células comprenden además un gen exógeno que codifica una enzima que procesar carbohidratos.
8. Las células modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además una alteración en la ruta de glicerol y/o la ruta de acetil-CoA.
9. Las células modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprenden además una ruta alternativa para generar etanol.
10. Las células modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde las células son de una *Saccharomyces* spp.
11. Un método para disminuir la producción de acetato a partir de células de levadura cultivadas en un sustrato glucídico, que comprende: introducir en células de levadura originales una alteración genética que aumenta la producción de polipéptidos PAB1 en comparación con la cantidad producida en las células originales, en donde la alteración genética comprende la introducción en las células originales de un ácido nucleico que puede dirigir la expresión de un polipéptido PAB1 hasta un nivel por encima del de la célula original cultivada en condiciones equivalentes.
12. El método de la reivindicación 11, en donde las células que tienen la alteración genética introducida son las células modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde la disminución en la producción de acetato es al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 % o al menos un 25 %.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde los polipéptidos PAB1 se sobreexpresan en al menos un 200 %.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde los polipéptidos PAB1 se sobreexpresan en al menos 15 veces.