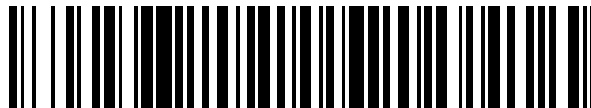


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 252**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12P 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2011 PCT/EP2011/067720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049170**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2011 E 11767263 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2627765**

54 Título: **Célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa**

30 Prioridad:

13.10.2010 US 392617 P
13.10.2010 EP 10075710

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WISSELINK, HENDRIK, WOUTER;
VAN MARIS, ANTONIUS, JEROEN, ADRIAAN y
PRONK, JACOBUS, THOMAS, JAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 629 252 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa

Campo de la invención

5 La invención se refiere a una célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa, adecuada para la fermentación de una composición sacárica que comprende un azúcar o azúcares C5 y C6 (esta composición también se denomina en la presente composición de azúcares mixtos). La composición de azúcares mixtos se puede originar a partir de un material lignocelulósico. La invención también se refiere a un procedimiento para la producción de un producto de fermentación a partir de la composición de azúcares mixtos usando la célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa.

10 Antecedentes de la invención

La mayoría del etanol producido como alternativa a los combustibles fósiles procede actualmente de la fermentación de almidón de maíz y sacarosa basada en caña de azúcar. A fin de alcanzar los ambiguos objetivos para producir combustibles renovables, se están desarrollando nuevas tecnología para convertir biomasa no alimentaria en productos de fermentación tales como etanol. *Saccharomyces cerevisiae* es el organismo de elección en la industria del etanol, pero no puede utilizar azúcares de cinco carbonos contenidos en el componente de hemicelulosa de las materias primas de la biomasa. La hemicelulosa puede constituir hasta 20-30% de la biomasa, siendo la xilosa y la arabinosa los azúcares C5 más abundantes. La expresión heteróloga de una xilosa isomerasa (XI) es una opción para permitir que las células de levadura se metabolicen fermenten la xilosa. Asimismo, la expresión de los genes bacterianos *araA*, *araB* y *araD* en cepas de *S. cerevisiae* da como resultado la utilización y la fermentación alcohólica eficaz de la arabinosa.

La fermentación de pentosa en etanol mediante especies fermentadoras de pentosa conocidas se produce lentamente y da como resultado bajos rendimientos con relación a las velocidades de fermentación y los rendimientos de etanol que se obtienen con levaduras convencionales en fermentaciones de glucosa. A fin de mejorar la rentabilidad de la fermentación de pentosa, es necesario incrementar la velocidad de fermentación y los rendimientos de etanol obtenidos.

S. cerevisiae tiene una preferencia inherente por la glucosa. Como consecuencia, todas las cepas fermentadoras de pentosa actuales demuestran una utilización secuencial de mezclas de glucosa y pentosas o en el mejor de los casos la fermentación de pentosa se inicial a bajas concentraciones de glucosa.

El documento WO2008041840 describe una célula eucariótica que expresa secuencias nucleotídicas que codifican las enzimas ara A, ara B y ara D, con lo que la expresión de estas secuencias nucleotídicas confiere a la célula la capacidad de usar L-arabinosa y/o convertir L-arabinosa en L-ribulosa y/o 5-fosfato de xilulosa y/o en un producto de fermentación deseado tal como etanol. Opcionalmente, la célula eucariótica también es capaz de convertir xilosa en etanol. La cepa IMS0003 (página 46) es capaz de consumir completamente en menos de 70 horas glucosa, xilosa y arabinosa, según se muestra en la figura 7. La figura 7 muestra que el consumo sustancial de xilosa y arabinosa comienza sólo después de 20 horas, es decir cuando la glucosa ya se ha convertido completamente. El consumo de glucosa y pentosa es secuencial.

Raamsdonk LM y cols., Yeast 2001; **18**; 1023-1003 describe el consumo simultáneo de azúcares o etanol y glucosa en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen *HXK2* eliminado. Sin embargo, la cepa difícilmente producía etanol y crece casi exclusivamente oxidativamente en presencia de abundante glucosa.

45 Sería deseable proporcionar una cepa de levadura que pudiera fermentar anaeróticamente pentosa simultáneamente con glucosa (cofermentación de pentosa y glucosa) y/o más rápidamente de lo que se conoce.

Sumario de la invención

Un objetivo de la invención es proporcionar una cepa de levadura que pueda cofermentar anaeróticamente pentosa y glucosa.

Un objetivo de la invención es proporcionar un método rentable para producir etanol mediante la fermentación de pentosa.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una célula de levadura que sea capaz de fermentar pentosa a una velocidad superior que la que se puede alcanzar usando cepas actualmente conocidas en la técnica.

Otro objetivo es reducir el tiempo de fermentación de la fermentación de C5/C6.

Otros objetivos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de una revisión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

5 Uno o más de estos objetivos se obtienen según la invención: un procedimiento para la preparación de una célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa, en donde una célula de levadura que es una célula de *Saccharomyces* que comprende uno o más genes exógenos de la ruta metabólica de la pentosa se somete a a) perturbación de cada uno de los genes *hxx2*, *hxx1* y *glk1* y *gal1* naturales en la célula de levadura, en donde b) la cepa perturbadora resultante se somete a manipulación evolutiva para mejorar el consumo de pentosa, hasta que la célula de levadura
10 tiene una velocidad de crecimiento de $0,05 \text{ h}^{-1}$ o más sobre la pentosa como única fuente de carbono y aislamiento de la célula de levadura fermentadora de pentosa resultante, y en donde c) en la levadura resultante se introduce uno o más de los genes *hxx1*, *hxx2*, *glk1* y *gal1*, a fin de restaurar su capacidad de consumir glucosa. En una realización de la misma, la cepa perturbadora es una célula de levadura que comprende uno o más genes exógenos de una o más rutas metabólicas de pentosa no naturales para la célula de levadura.

15 Esta célula con una o más perturbaciones se denomina en la presente célula de levadura perturbadora. La célula con perturbación del *hxx1*, *hxx2*, *glk1* y *gal1* también se denomina en la presente perturbador cuádruple.

20 La invención se refiere además a un procedimiento para la preparación de una célula de levadura fermentadora de pentosa, en donde una célula de levadura que comprende uno o más genes exógenos de una ruta de pentosa se somete a una perturbación del gen *hxx2* natural en la célula de levadura, en donde la célula de levadura perturbadora resultante se somete a manipulación evolutiva para mejorar el consumo de pentosa, hasta que la célula de levadura tiene una velocidad de crecimiento de $0,05 \text{ h}^{-1}$ o más sobre la pentosa como única fuente de carbono y aislamiento de la célula de levadura fermentadora de levadura resultante. En una realización, la célula de
25 levadura fermentadora de pentosa no es capaz de consumir glucosa. La célula que es el producto de la manipulación evolutiva se denomina en la presente célula de levadura fermentadora de pentosa.

30 En una realización preferida de este procedimiento, la célula perturbadora es una célula de levadura que comprende uno o más genes exógenos que permiten que las células fermenten pentosa, en donde la célula tiene una perturbación de *hxx1*, *hxx2*, *glk1* y *gal1* naturales en la célula de levadura, es decir es un perturbador cuádruple.

35 En una realización, la célula de levadura fermentadora de pentosa comprende una o más hexocinasas exógenas. Mediante la reintroducción de la actividad de hexocinasa a través de una hexocinasa exógena, se puede restaurar el consumo de glucosa por la célula de levadura fermentadora de pentosa. Preferiblemente, la hexocinasa o hexocinasas exógenas tienen la misma actividad que la hexocinasa o las hexocinasas naturales en la célula de levadura. Esta célula de levadura en la que se ha reintroducidos hexocinasa se denomina en la presente célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa o célula de levadura. La invención se refiere además a una célula de *Saccharomyces* fermentadora de pentosa y glucosa que es capaz de un consumo anaerobio simultáneo de pentosa y glucosa.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲) y etanol (■) y la densidad óptica a 660 nm (OD660, ●) durante cultivos en matraz agitado de las cepas DS62504 (FIG.1 (a)), IMK307 (FIG. 1 (b)) y IMK311 (FIG. 1 (c)).

45 La FIG. 2 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲) y etanol (■) y el porcentaje de CO₂ en el gas de escape (línea negra sólida) durante los cultivos anaerobios de las cepas DS62504 (FIG. 2 (a)), IMK307 (FIG. 2 (b)) y IMK311 (FIG. 2 (c)). Las fermentaciones se inocularon con cultivos en matraz agitado desarrollados en glucosa.

50 La FIG. 3 muestra perfiles de crecimiento determinados al medir la densidad óptica a 660 nm (OD660) para cultivos en matraz agitado de la cepa IMK318 en MYurea que contiene 2% de arabinosa y diversas concentraciones de glucosa (0, 0,11, 0,23, 0,65, 1,3 y 2,5 %)

FIG. 4 Concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲) y etanol (■) y densidad óptica a 660 nm (OD660, ●) durante cultivos en matraz agitado de: cepa IMK318, transferida en serie según la tabla 3 (Serie A: SF1, SF2 y SF5); el aislado de una sola colonia seleccionado de esta serie de matraces agitados, IMW018.

55 La FIG. 5 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲) y etanol (■) y la densidad óptica a 660 nm (OD660, ●) durante cultivos en matraz agitado de: cepa IMK318, transferida en serie según la tabla 3 (Serie B: SF1, SF2 y SF3); el aislado de una sola colonia seleccionado de esta serie de matraces agitados, IMW017.

- La FIG. 6 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲) y etanol (■) y el porcentaje de CO₂ en el gas de escape (línea gris sólida) durante los cultivos anaerobios secuenciales de la cepa IMW017.
- La FIG. 7 muestra el porcentaje de CO₂ en el gas de escape (línea gris sólida) y las velocidades de crecimiento de cultivos anaerobios secuenciales de la cepa IMW017. Las velocidades de crecimiento específicas se derivan del perfil de producción de CO₂ durante los cultivos discontinuos bien en la mezcla de glucosa y arabinosa (●) o bien solamente en arabinosa (◆).
- La FIG. 8 muestra los perfiles de producción de CO₂ de los lotes individuales en medio complementado con arabinosa (A) y una mezcla de glucosa y arabinosa (B) durante el cultivo discontinuo anaerobio secuencial de la cepa IMW017. Los perfiles de producción de CO₂ se alinean suponiendo un nivel de producción de CO₂ inicial igual. Los números en la leyenda indican los números de lote consecutivos.
- La FIG. 9 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲) y etanol (■) y el porcentaje de CO₂ en el gas de escape (línea gris sólida) durante los lotes 24 y 25 del cultivo discontinuo anaerobio secuencial de la cepa IMW017.
- La FIG. 10 muestra la actividad de enzima hexocinasa de las cepas DS62504, IMK307, IMK311, IMK318, IMW017 y IMW018.
- La FIG. 11 muestra la OD660 (●), la concentración de arabinosa (▲) y la concentración de glucosa (◆) durante un cultivo en matraz agitado de la cepa IMW023 en medio MY complementado con 2% de glucosa y 2% de arabinosa.
- La FIG. 12 muestra la OD660 (●), la concentración de arabinosa (▲) y la concentración de glucosa (◆) durante el primer (SF1) y el 24^o (SF24) cultivo en matraz agitado de un cultivo transferido en serie de la cepa IMW023 en medio MY complementado con 2% de glucosa y 2% de arabinosa.
- La FIG. 13 muestra las velocidades de crecimiento específicas estimadas determinadas en los cultivos en matraz agitado individuales de un cultivo transferido en serie de la cepa IMW023 en medio MY complementado con 2% de glucosa y 2% de arabinosa.
- La FIG. 14 muestra el porcentaje de CO₂ en el gas de escape (línea gris sólida) y las velocidades de crecimiento específicas durante cultivos discontinuos anaerobios secuenciales de la cepa IMW023 en medio MY complementado con 20 g/litro de glucosa y 20 g/litro de arabinosa, y las velocidades de crecimiento específicas de los cultivos discontinuos individuales (●). El tono gris indica cuando se suministraba aire en lugar de nitrógeno gaseoso. Las flechas indican el inicio de un nuevo lote consecutivo.
- La FIG. 15 muestra el porcentaje de CO₂ en el gas de escape (línea gris sólida), la concentración de arabinosa (▲) y la concentración de glucosa (◆) durante cultivos discontinuos anaerobios secuenciales de la cepa IMW023 en medio MY complementado con 20 g/litro de glucosa y 20 g/litro de arabinosa.
- La FIG. 16 muestra los perfiles de producción CO₂ alienados de los lotes individuales durante el cultivo discontinuo secuencial anaerobio de la cepa IMW023 en medio MY complementado con 20 g/litro de glucosa y 20 g/litro de arabinosa. Los perfiles de producción de CO₂ se alinean suponiendo un nivel de producción de CO₂ inicial igual. Los números de la leyenda indican los números de lote consecutivos.
- La FIG. 17 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲) y etanol (□) y la densidad óptica a 660 nm (OD660, ●) durante cultivos en matraz agitado de las cepas DS62504 (FIG. 17 (a)), IMK307 (FIG. 17 (b)), IMK311 (FIG. 17 (c)), IMW017 (FIG. 17 (d)), IMW018 (FIG. 17 (e)) y IMW058 (FIG. 17 (f)), IMW024 (FIG. 17 (g)), IMW025 (FIG. 17 (h)), IMW047 (FIG. 17 (i)), IMW059 (FIG. 17 (j)), IMW060 (FIG. 17 (k)), IMW061 (l)).
- La FIG. 18 muestra las concentraciones de glucosa (◆) y arabinosa (▲) durante un cultivo en matraz agitado de la cepa IMW047.
- La FIG. 19 muestra el alineamiento de aminoácidos de GAL1 de las cepas CEN.PK 113-7D, IMK318, IMW017 y IMW018.
- La FIG. 20 muestra el alineamiento de aminoácidos de GAL2 de las cepas CEN.PK 113-7D, IMK318, IMW017 y IMW018.

La FIG. 21 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲), etanol (□), los pesos secos de biomasa (●) y la producción de CO₂ (línea gris sólida) durante el cultivo anaerobio de la cepa IMW059 en medio MY complementado con 20 g l⁻¹ de glucosa y 20 g l⁻¹ de arabinosa.

5 La FIG. 22 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲), etanol (□), los pesos secos de biomasa (●) y la producción de CO₂ (línea gris sólida) durante el cultivo anaerobio de la cepa IMW060 en medio MY complementado con 20 g l⁻¹ de glucosa y 20 g l⁻¹ de arabinosa.

La FIG. 23 muestra las concentraciones de glucosa (◆), arabinosa (▲), etanol (□), los pesos secos de biomasa (●) y la producción de CO₂ (línea gris sólida) durante el cultivo anaerobio de la cepa IMW061 en medio MY complementado con 20 g l⁻¹ de glucosa y 20 g l⁻¹ de arabinosa.

10 La FIG. 24 muestra los perfiles de producción de CO₂ de cepas DS62504 (línea negra de puntos), IMW059 (línea negra sólida), IMW060 (línea negra sólida) y IMW061 (línea negra rayada) durante el cultivo anaerobio en una mezcla de 20 g l⁻¹ de glucosa y 20 g l⁻¹ de arabinosa.

La FIG. 25 muestra las concentraciones de glucosa (◆), manosa (◇), arabinosa (▲) y etanol (□) durante cultivos en matraz agitado de la cepa DS62504 sobre medio CFMM2M.

15 La FIG. 26 muestra las concentraciones de glucosa (◆), manosa (◇), arabinosa (▲) y etanol (□) durante cultivos en matraz agitado de la cepa IMW060 sobre medio CFMM2M.

FIG. 27 muestra las concentraciones de glucosa (◆), manosa (◇), arabinosa (▲) y etanol (□) durante cultivos en matraz agitado de la cepa IMW061 sobre medio CFMM2M.

20 FIG. 28 muestra las concentraciones de glucosa (◆), manosa (◇), arabinosa (▲) y etanol (□) durante cultivos en matraz agitado de la cepa DS62504 sobre medio CFMM1M.

25 FIG. 29 muestra las concentraciones de glucosa (◆), manosa (◇), arabinosa (▲) y etanol (□) durante cultivos en matraz agitado de la cepa IMW060 sobre medio CFMM1M.

FIG. 30 muestra las concentraciones de glucosa (◆), manosa (◇), arabinosa (▲) y etanol (□) durante cultivos en matraz agitado de la cepa IMW061 sobre medio CFMM1M.

Breve descripción del listado de secuencias

Oligonucleótidos usados para la construcción de casetes de perturbación génica:

30 SEQ ID N°: 1 indica la secuencia del oligonucleótido HXK2-disA

SEQ ID N°: 2 indica la secuencia del oligonucleótido HXK2-disB

SEQ ID N°: 3 indica la secuencia del oligonucleótido HXK1-disA

SEQ ID N°: 4 indica la secuencia del oligonucleótido HXK1-disB

SEQ ID N°: 5 indica la secuencia del oligonucleótido GLK1-disA

35 SEQ ID N°: 6 indica la secuencia del oligonucleótido GLK1-disB

Oligonucleótidos usados con propósitos de diagnóstico:

SEQ ID N°: 7 indica la secuencia del oligonucleótido KanA

40 SEQ ID N°: 8 indica la secuencia del oligonucleótido KanB

SEQ ID N°: 9 indica la secuencia del oligonucleótido HXK2-FW

- SEQ ID Nº: 10 indica la secuencia del oligonucleótido HXK2-RV
- SEQ ID Nº: 11 indica la secuencia del oligonucleótido HXK1-FW
- SEQ ID Nº: 12 indica la secuencia del oligonucleótido HXK1-RV
- SEQ ID Nº: 13 indica la secuencia del oligonucleótido GLK1-FW
- 5 SEQ ID Nº: 14 indica la secuencia del oligonucleótido GLK1-RV
- SEQ ID Nº: 15 indica la secuencia de ADN de HXK1
- SEQ ID Nº: 16 indica la secuencia de ADN de HXK2
- SEQ ID Nº: 17 indica la secuencia de ADN de GLK1
- SEQ ID Nº: 18 indica la secuencia de ADN de GAL1
- 10 SEQ ID Nº: 19 indica la secuencia de ADN de YDR516C
- SEQ ID Nº: 20 indica la secuencia de ADN de YLR446W
- SEQ ID Nº: 21 indica la secuencia de aminoácidos de HXK1
- SEQ ID Nº: 22 indica la secuencia de aminoácidos de HXK2
- SEQ ID Nº: 23 indica la secuencia de aminoácidos de GLK1
- 15 SEQ ID Nº: 24 indica la secuencia de aminoácidos de GAL1
- SEQ ID Nº: 25 indica la secuencia de aminoácidos de YDR516C
- SEQ ID Nº: 26 indica la secuencia de aminoácidos de YLR446W
- SEQ ID Nº: 27 indica la secuencia del oligonucleótido GAL1-DisA
- SEQ ID Nº: 28 indica la secuencia del oligonucleótido GAL1-DisB
- 20 SEQ ID Nº: 29 indica la secuencia del oligonucleótido GAL1-FW2
- SEQ ID Nº: 30 indica la secuencia del oligonucleótido GAL1-RV2
- SEQ ID Nº: 31 indica la secuencia del oligonucleótido HXK2-FW2
- SEQ ID Nº: 32 indica la secuencia del oligonucleótido HXK2-RV2
- SEQ ID Nº: 33 indica la secuencia del oligonucleótido HXK2-FW3
- 25 SEQ ID Nº: 34 indica la secuencia del oligonucleótido HXK2-RV3
- SEQ ID Nº: 35 indica la secuencia del oligonucleótido HXK1-FW2
- SEQ ID Nº: 36 indica la secuencia del oligonucleótido HXK1-RV2
- SEQ ID Nº: 37 indica la secuencia del oligonucleótido HXK1-FW3

- SEQ ID N°: 38 indica la secuencia del oligonucleótido HXK1-RV3
- SEQ ID N°: 39 indica la secuencia del oligonucleótido GLK1-FW4
- SEQ ID N°: 40 indica la secuencia del oligonucleótido GLK1-RV4
- SEQ ID N°: 41 indica la secuencia del oligonucleótido GLK1-FW5
- 5 SEQ ID N°: 42 indica la secuencia del oligonucleótido GLK1-RV5
- SEQ ID N°: 43 indica la secuencia de ADN de GAL1 (CEN.PK 113-7D)
- SEQ ID N°: 44 indica la secuencia de ADN de GAL1 (IMK318)
- SEQ ID N°: 45 indica la secuencia de ADN de GAL1 (IMW017)
- SEQ ID N°: 46 indica la secuencia de ADN de GAL1 (IMW018)
- 10 SEQ ID N°: 47 indica la secuencia de ADN de GAL2 (CEN.PK 113-7D)
- SEQ ID N°: 48 indica la secuencia de ADN de GAL2 (IMK318)
- SEQ ID N°: 49 indica la secuencia de ADN de GAL2 (IMW017)
- SEQ ID N°: 50 indica la secuencia de ADN de GAL2 (IMW018)
- SEQ ID N°: 51 indica la secuencia de aminoácidos de GAL1 (CEN.PK 113-7D)
- 15 SEQ ID N°: 52 indica la secuencia de aminoácidos de GAL1 (IMK318)
- SEQ ID N°: 53 indica la secuencia de aminoácidos de GAL1 (IMW017)
- SEQ ID N°: 54 indica la secuencia de aminoácidos de GAL1 (IMW018)
- SEQ ID N°: 55 indica la secuencia de aminoácidos de GAL2 (CEN.PK 113-7D)
- SEQ ID N°: 56 indica la secuencia de aminoácidos de GAL2 (IMK318)
- 20 SEQ ID N°: 57 indica la secuencia de aminoácidos de GAL2 (IMW017)
- SEQ ID N°: 58 indica la secuencia de aminoácidos de GAL2 (IMW018)

Descripción detallada de la invención

25 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprenden" e "incluyen" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" se han de interpretar inclusivamente. Esto es, estas palabras pretenden transmitir la posible inclusión de otros elementos o integrantes no citados específicamente, cuando el contexto lo permita.

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

Las diversas realizaciones de la invención descritas en la presente se pueden combinar entre sí.

35 Se entiende que perturbación significa en la presente cualquier perturbación de la actividad, e incluye, pero no se limita a, eliminación, mutación, reducción de la afinidad del gen perturbado y expresión de ARN antisentido

- complementario a ARNm de hexocinasa. Un perturbador génico es una célula que tiene una o más perturbaciones del gen respectivo. Se entiende en la presente natural en levadura como que el gen está presente en la célula de levadura antes de la perturbación. Incluye la situación en la que el gen natural en levadura está presente en una célula de levadura silvestre, una célula de levadura de laboratorio o una célula de levadura industrial. Célula de levadura también se puede indicar en la presente como cepa de levadura o como parte de la cepa de levadura.
- 5
- En una realización, la célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa que produce etanol a una velocidad global superior que la correspondiente cepa silvestre y tiene un tiempo de fermentación más breve y/o consume simultáneamente pentosa y glucosa, preferiblemente consume simultáneamente estas anaerobiamente pentosa y simultáneamente, en oposición a secuencialmente.
- 10
- En una realización, la levadura comprende una hexocinasa exógena. Preferiblemente, la hexocinasa exógena introduce en la célula una actividad de hexocinasa.
- 15
- Exógeno se entiende en la presente como no presente en la célula de levadura antes de la introducción de la hexocinasa. Una hexocinasa exógena puede incluir, pero no se limita a, un gen que es natural en levadura o un gen que tiene la misma secuencia que la hexocinasa perturbada.
- 20
- En una realización de la invención, la célula de levadura es una cepa en la que se efectúa una expresión reducida de hexocinasa en la variante de levadura por un medio seleccionado del grupo que consiste en la perturbación del gen de hexocinasa y la expresión de ARN antisentido complementario a ARNm de hexocinasa.
- 25
- En una realización de la invención, la célula de levadura es un perturbador de hexocinasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30
- En otra realización, la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae* IMW017, IMW018, IMK306, IMK307 y/o IMK318.
- 35
- En una realización, la célula de levadura tiene una velocidad de producción de etanol global que es al menos aproximadamente 20% superior, al menos aproximadamente 50% o al menos aproximadamente 100% superior que la levadura silvestre correspondiente.
- 40
- La invención se refiere además a un procedimiento para producir etanol a partir de la fermentación de pentosa, que comprende la etapa de: cultivar una célula de levadura según la invención en una composición sacárica que contiene pentosa bajo condiciones de fermentación adecuadas durante un período de tiempo suficiente para permitir la fermentación de pentosa en etanol, en donde la célula de levadura fermenta pentosa para producir etanol con un nivel alto con relación a la levadura silvestre correspondiente y en donde la célula de levadura tiene una expresión reducida de hexocinasa funcional, con relación a la levadura silvestre correspondiente.
- 45
- En una realización del procedimiento, el tiempo de fermentación se reduce con relación a la correspondiente fermentación de levadura silvestre, preferiblemente el tiempo de fermentación se reduce 40% o más.
- 50
- En una realización del procedimiento, se cofermentan pentosa y glucosa. En otra realización del procedimiento, la velocidad de producción de etanol global es al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 50% o aproximadamente 100% superior que la del procedimiento con la levadura silvestre correspondiente.
- 55
- En una realización del procedimiento, la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae* IMW017, IMW018, IMK306, IMK307 y/o IMK318.
- 60
- En una realización del procedimiento, el material que contiene pentosa comprende un hidrolizado de material lignocelulósico.
- 65
- En una realización del procedimiento, el hidrolizado es un hidrolizado enzimático de material lignocelulósico.
- La invención se refiere además al uso de una perturbación de una o más hexocinasas en levadura en un procedimiento de manipulación evolutiva y/o un procedimiento de mejora de la cepa de levadura. Estos son procedimientos conocidos. La manipulación evolutiva es un procedimiento en el que fenotipos industrialmente pertinentes de un microorganismo, en la presente la levadura, se pueden acoplar a la velocidad de crecimiento específica y/o la afinidad por un nutriente, mediante un procedimiento de selección natural establecido racionalmente. La manipulación evolutiva se describe por ejemplo en Kuijper, M, y cols., FEMS Yeast Research 5(2005) 925-934, y los documentos WO2008041840 y WO2009112472. Después de la manipulación evolutiva, la célula de levadura fermentadora de pentosa resultante se aísla. El aislamiento se puede ejecutar de cualquier modo conocido, p. ej. mediante la separación de células de un caldo de células de levadura en la manipulación evolutiva, por ejemplo al recoger una muestra de células o mediante filtración o centrifugación.

La presente invención es una célula de levadura que fermenta pentosa en mezclas de azúcares que también contienen glucosa a una velocidad superior que la levadura silvestre correspondiente, la célula de levadura caracterizada por la expresión reducida de uno o más genes de hexocinasa naturales.

5 Sin limitaciones en el alcance de la invención y sin querer limitarse por una teoría, este fenómeno es lo más probablemente una consecuencia de la inhibición competitiva del transporte de pentosa por glucosa o debido a la represión de glucosa de genes cruciales para la fermentación de pentosa o debido a la inactivación o la degradación de proteínas implicada o la reducción de la afinidad en presencia de glucosa. En presencia de glucosa, la manipulación evolutiva para el crecimiento sobre pentosas de cepas que ya no utilizan (no pueden utilizar) glucosa debe dar como resultado un fenotipo insensible a glucosa. Esta cepa, que ya no puede consumir glucosa, se puede obtener por ejemplo mediante la eliminación de las tres hexo/gluco-cinasas (hvk1Δ hvk2Δ glk1Δ). En la presente, se muestra que también la eliminación de gal1 (gal1Δ) es ventajosa para disminuir adicionalmente el consumo de glucosa en el perturbador triple, creando así un perturbador cuádruple.

15 La presente invención es además un método para producir etanol a partir de la fermentación de pentosa, que comprende la etapa de: cultivar una célula de levadura en un material que contiene pentosa bajo condiciones de fermentación adecuadas durante un período de tiempo suficiente para permitir la fermentación de pentosa en etanol, siendo capaz de variante de levadura de fermentar pentosa a una velocidad alta con relación a la levadura silvestre correspondiente y teniendo una expresión reducida de hexocinasa funcional.

20 La célula de levadura de la presente invención es un perturbador de hexocinasa. Por un perturbador de hexocinasa se entiende una variante en la que una parte o todo el gen natural se retira o reemplaza por ADN del que la expresión no da como resultado un producto de expresión que tenga ninguna función de la hexocinasa natural.

25 En una realización alternativa del perturbador, la expresión de hexocinasa se puede regular a la baja a través del uso de una construcción antisentido en la que parte o la totalidad de la hebra antisentido que codifica hexocinasa se expresa bajo la regulación de un promotor que responde a oxígeno reducido. En esta realización, el ARNm antisentido para hexocinasa se expresa bajo condiciones limitativas de oxígeno y de ese modo inactiva la hexocinasa funcional.

30 En otra realización alternativa del perturbador, la región promotora para la hexocinasa funcional se reemplaza por un promotor que responde a oxígeno reducido al regular a la baja la expresión del gen de hexocinasa.

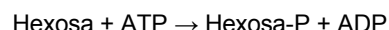
35 Por levadura "silvestre", se entiende una cepa de levadura fermentadora de pentosa con niveles normales de hexocinasa funcional de la que se deriva la célula de levadura de la presente invención. En ciertos casos, la "levadura silvestre", según se define en esta solicitud de patente, puede incluir levadura mutagenizada. Por ejemplo, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DS62504, a partir de la que se desarrollaron IMW017, IMW018, IMK306, IMK307 y IMK318, es por sí misma una cepa de levadura mutada. Sin embargo, DS62504 también es una levadura silvestre, según se define en la presente, debido a que es una levadura fermentadora de pentosa con niveles normales de hexocinasa funcional que se usaba para desarrollar una célula de levadura de la presente invención.

40 Hexocinasa (hvk) es en la presente cualquier enzima que fosforile un azúcar de seis carbonos, una hexosa, en un fosfato de hexosa. En la mayoría de los tejidos y organismos, la glucosa es el sustrato más importante de las hexocinasas, y el 6-fosfato de glucosa es el producto más importante.

45 Las hexocinasas se han encontrado en la mayoría de los organismos comprobados, variando de bacterias, levaduras y plantas a seres humanos y otros vertebrados. Se clasifican como proteínas de plegamiento de actina, compartiendo un centro del sitio de unión a ATP común rodeado por secuencias más variables que determinan afinidades a sustratos y otras propiedades. Varias isoformas o isozimas de hexocinasa que proporcionan diferentes funciones se pueden presentar en una sola especie.

Reacción de hexocinasa:

Las reacciones intracelulares mediadas por hexocinasas se pueden tipificar como:



La célula de levadura

55 Según la invención, la perturbación de la actividad de hexocinasa natural conduce a un tiempo de fermentación más breve en la fermentación de C5/C6 y/o al consumo simultáneo por la célula de levadura de pentosa y glucosa.

Se obtuvieron células de levadura resultantes, denominadas IMW017, IMW018, IMK306, IMK307 y/o IMK318, y se han caracterizado como se describe con detalle posteriormente. Se anticipa que una célula de levadura de *S.*

cerevisiae caracterizada por la expresión reducida del gen de hexocinasa funcional y un rendimiento de etanol global incrementado se puede obtener por medios distintos a la eliminación del gen de hexocinasa mediante la integración específica del sitio en una etapa. Por ejemplo, una variante que carece de hexocinasa funcional, o que expresa hexocinasa a un nivel reducido, se podría obtener mediante cualquiera de varios medios conocidos en la técnica, tales como exponer las células de levadura a agentes intercaladores de ADN o irradiar la células de levadura con luz ultravioleta. Es probable que las células deficientes en hexocinasa se puedan distinguir de las células silvestres basándose en el tamaño de las colonias y otros patrones morfológicos (es decir, colonias amarillas de pequeño tamaño con una apariencia arrugada). El estado de hexocinasa de colonias deficientes en hexocinasa putativas presuntamente identificadas basándose en este fenotipo único se podía confirmar, por ejemplo, por la incapacidad para crecer sobre medio que contiene glucosa como la única fuente de carbono o por determinaciones de la actividad de hexocinasa.

La célula de levadura contiene típicamente genes de una ruta metabólica de pentosa no naturales para la levadura y/o que permiten que la célula de levadura convierta pentosa o pentosas. En una realización, la célula de levadura puede comprender uno o dos o más copias de una o más xilosa isomerasas y/o una o más copias de uno o más genes de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, permitiendo que la célula de levadura convierta xilosa. En una realización de los mismos, estos genes se pueden integrar en el genoma de la célula de levadura. En otra realización, la célula de levadura comprende los genes *araA*, *araB* y *araD*. Entonces, es capaz de fermentar arabinosa. En una realización de la invención, la célula de levadura comprende el gen *xyIA*, el gen *XYL1* y el gen *XYL2* y/o el gen *XKS1*, para permitir que la célula de levadura fermente xilosa; la eliminación del gen de aldosa reductasa (*GRE3*); la sobreexpresión de los genes *PPP*, *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RK1* para permitir el incremento del flujo a través del paso de fosfato de pentosa a la célula, y/o la sobreexpresión de *GAL2* y/o la eliminación de *GAL80*. Así, a través de la inclusión de los genes anteriores, se pueden introducir en la célula de levadura una ruta de pentosa u otras rutas metabólicas adecuadas que no eran naturales en la célula de levadura (silvestre).

En una realización, la célula de levadura se deriva de una levadura industrial, mediante la perturbación de hexocinasa. Una célula industrial y una célula de levadura industrial se pueden definir como sigue. Los ambientes vivos de las células (de levadura) en los procedimientos industriales son significativamente diferentes de los del laboratorio. Las células de levadura industriales deben ser capaces de comportarse bien bajo múltiples condiciones ambientales que pueden variar durante el procedimiento. Tales variaciones incluyen un cambio en las fuentes de nutrientes, el pH, la concentración de etanol, la temperatura, la concentración de oxígeno, etc., que juntos tienen un impacto potencial sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae*. Bajo condiciones industriales adversas, las cepas tolerantes al ambiente permiten un crecimiento y una producción robustos. Generalmente, las cepas de levadura industriales son más robustas hacia estos cambios en condiciones ambientales que se pueden presentar en aplicaciones en las que se usan, tales como en la industria de la panadería, la industria cervecera, la elaboración de vino y la industria del etanol. En una realización, la célula de levadura industrial se construye basándose en una célula hospedadora industrial, en donde la construcción se efectúa como se describe anteriormente en la presente. Ejemplos de levadura industrial (*S. cerevisiae*) son Ethanol Red® (Fermentis) Fermiol® (DSM) y Thermosacc® (Lallemand).

En una realización, la célula de levadura es tolerante a inhibidores. La tolerancia a Inhibidores es la resistencia a compuestos inhibidores. La presencia y el nivel de compuestos inhibidores en lignocelulosa puede variar ampliamente con la variación de la materia prima, el procedimiento de hidrólisis del método de tratamiento. Ejemplos de categorías de inhibidores son ácidos carboxílicos, furanos y/o compuestos fenólicos. Ejemplos de ácidos carboxílicos son ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico. Ejemplos de furanos son furfural e hidroximetilfurfural. Ejemplos o compuestos fenólicos son vainillina, ácido siríngico, ácido ferúlico y ácido cumárico. Las cantidades típicas de inhibidores son para ácidos carboxílicos: varios gramos por litro, hasta 20 gramos por litro o más, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis. Para furanos: de varios cientos de miligramos por litro hasta varios gramos por litro, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis. Para compuestos fenólicos: de varias decenas de miligramos por litro hasta un gramo por litro, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis.

Las células de levadura según la invención son preferiblemente tolerantes a inhibidores, es decir pueden soportar inhibidores comunes al nivel que tienen típicamente con condiciones de pretratamiento e hidrólisis comunes, de modo que las células de levadura puedan encontrar una amplia aplicación, es decir tiene su aplicabilidad para diferentes materias primas, diferentes métodos de pretratamiento y diferentes condiciones de hidrólisis.

En una realización, la célula de levadura industrial se construye basándose en una célula hospedadora tolerante a inhibidores, en donde la construcción se efectúa como se describe anteriormente en la presente. Las células hospedadoras tolerantes a inhibidores se pueden seleccionar al cribar cepas con respecto al crecimiento sobre materiales que contienen inhibidores, tal como en Kadar y cols, Appl. Biochem. Biotechnol. (2007), Vol. 136-140, 847-858, en donde se seleccionaba una cepa de *S. cerevisiae* ATCC 26602 tolerante a inhibidores.

En una realización, la célula de levadura está libre de marcador. Según se usa en la presente, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección de, o el cribado con respecto a, una célula hospedadora que contiene el marcador. Libre de marcador significa que los marcadores están esencialmente

ausentes en la célula de levadura. Estar libre de marcador es particularmente ventajoso cuando se han usado marcadores de antibióticos en la construcción de la célula de levadura y se retiran posteriormente. La retirada de marcadores se puede realizar usando cualquier técnica anterior, p. ej. recombinación intramolecular. Un método adecuado de retirada de marcadores se ilustra en los ejemplos.

5 La célula de levadura puede comprender además las actividades enzimáticas requeridas para la conversión de piruvato en un producto de fermentación deseado, tal como etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama o una cefalosporina.

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

15 Cualquiera de las características o actividades anteriores de una célula de levadura puede estar presente naturalmente en la célula o se puede introducir o modificar mediante modificación genética.

Construcción de la célula de levadura

20 Según una realización, los genes se pueden introducir en la célula de levadura mediante la introducción en una célula hospedadora:

a) un aglomerado que consiste en genes PPP *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RK1*, opcionalmente bajo el control de un promotor constitutivo fuerte;

b) un aglomerado que consiste en un gen *xyIA* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte;

25 c) un aglomerado que consiste en un gen *XKS1*-gene bajo el control de un promotor constitutivo fuerte,

d) un aglomerado que consiste en los genes *araA*, *araB* y *araD* bajo el de un promotor constitutivo fuerte

e) eliminación de un gen de aldosa reductasa

f) perturbación de uno o más genes de hexocinasa naturales en levadura;

g) manipulación evolutiva de la cepa que resulta de a) a e);

30 y opcionalmente

h) introducción de uno o más genes de hexocinasa exógenos en la célula que resulta de la manipulación evolutiva para producir la célula de levadura.

La célula anterior se puede construir usando técnicas de expresión recombinante conocidas.

Expresión recombinante

35 La célula de levadura es una célula recombinante. Es decir, una célula de levadura comprende, o se transforma con o se modifica genéticamente con una secuencia nucleotídica que no está presente naturalmente en la célula en cuestión.

40 Técnicas para la expresión recombinante de enzimas en una célula, así como para las modificaciones genéticas adicionales de una célula de levadura, son muy conocidas en la especialidad. Típicamente, estas técnicas implican la transformación de una célula con una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia pertinente. Estos métodos se conocen, por ejemplo, de manuales estándar, tales como Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, o F. Ausubel y cols., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987). Métodos para la transformación y la modificación genética de células hospedadoras fúngicas se conocen de los documentos, p. ej., EP-A-0635 574, WO 98/46772, WO 99/60102, WO 00/37671, WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 y US 6,265,186.

Identidad de secuencia

Se dice que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son homologas cuando exhiben un cierto nivel de similitud. Que dos secuencias sean homólogas indica un origen evolutivo común. Que dos secuencias homólogas estén estrechamente relacionadas o más distantemente relacionadas está indicado por el "porcentaje de identidad" o el "porcentaje de similitud", que es alto o bajo, respectivamente. Aunque es discutido, para indicar el "porcentaje de identidad" o el "porcentaje de similitud", frecuentemente se usan intercambiamente "nivel de homología" o "porcentaje de homología".

Los términos "homología", "porcentaje de homología", "porcentaje de identidad" o "porcentaje de similitud" se usan intercambiamente en la presente. Para el propósito de esta invención, se define aquí que a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias completas se alinean con propósitos de comparación óptima. A fin de optimizar el alineamiento entre dos secuencias se pueden introducir huecos en cualquiera de las dos secuencias que se comparan. Este alineamiento se lleva a cabo a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan. Alternativamente, el alineamiento se puede llevar a cabo a lo largo de una longitud más corta, por ejemplo a lo largo de aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos/basados o aminoácidos. La identidad es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias a lo largo de la región alineada presentada.

Una comparación de secuencias y una determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede efectuar usando un algoritmo matemático. El experto conocerá el hecho de que están disponibles varios programas informáticos diferentes para linear dos secuencias y determinar la homología entre dos secuencias (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison in D. Sankoff y J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch para el alineamiento de dos secuencias. (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). El algoritmo alinea secuencias de aminoácidos así como secuencias de nucleótidos. El algoritmo de Needleman-Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE. Para el propósito de esta invención, se usó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para secuencias proteínicas, EBLOSUM62 se usa para la matriz de sustitución. Para secuencias nucleotídicas, se usa EDNAFULL. Se pueden especificar otras matrices. Los parámetros opcionales usados para el alineamiento de secuencias de aminoácidos son una penalización por apertura de huecos de 10 y una penalización por extensión de huecos de 0,5. El experto apreciará que todos estos diferentes parámetros darán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan diferentes algoritmos.

Definición de homología global

La homología o identidad es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias completas a lo largo de la región alineada incluyendo cualesquiera huecos o extensiones. La homología o identidad entre las dos secuencias alienadas se calcula como sigue: Numero de las posiciones correspondientes en el alineamiento que muestran un aminoácido idéntico en ambas secuencias dividido por la longitud total del alineamiento incluyendo los huecos. La identidad definida como en la presente se puede obtener a partir de NEEDLE y se señala en los resultados del programa como "IDENTIDAD".

Definición de la identidad más larga

La homología o identidad entre las dos secuencias alineadas se calcula como sigue: Número de posiciones correspondientes en el alineamiento que muestran un aminoácido idéntico en ambas secuencias dividido por la longitud total del alineamiento después de la sustracción del número total de huecos del alineamiento. La identidad definida como en la presente se puede obtener a partir de NEEDLE al usar la opción NOBRIEF y se señala en los resultados del programa como la "identidad más larga". Para los propósitos de la invención, el nivel de identidad (homología) entre dos secuencias (aminoácido o nucleótido) se calcula según la definición de la "identidad más larga" que se puede llevar a cabo al usar el programa NEEDLE.

Las secuencias proteínicas usadas en la presente invención se pueden usar como una "secuencia incógnita" para realizar una búsqueda frente a bases de datos de secuencias, por ejemplo para identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas BLAST. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través de the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). BLASTP se usa para secuencias de aminoácidos y BLASTN para secuencias de nucleótidos. El programa BLAST usa como defectos:

Coste de abrir un hueco: defecto = 5 para nucleótidos/11 para proteínas

Coste de extender un hueco: defecto = 2 para nucleótidos/ 1 para proteínas

Penalización para falta de coincidencia de nucleótidos: defecto = -3

Recompensa por coincidencia de nucleótidos: defecto = 1

Valor esperado: defecto = 10

5 Tamaño de la palabra: defecto = 11 para nucleótidos/ 28 para megablast/ 3 para proteínas

10 Por otra parte, el grado de identidad (homología) local entre la secuencia de aminoácidos incógnita o la secuencia de ácido nucleico incógnita y las secuencias homólogas buscadas se determina mediante el programa BLAST. Sin embargo, solo se comparan los segmentos de secuencia que dan una coincidencia por encima de un cierto umbral. Según esto, el programa calcula la identidad solamente para estos segmentos coincidentes. Por lo tanto, la identidad calculada de este modo se denomina identidad local.

Producción de bioproductos

15 A lo largo de los años se han hecho sugerencias para la introducción de diversos organismos para la producción de bioetanol a partir de azúcares de cultivo. Sin embargo, en la práctica, todos los procedimientos de producción de bioetanol han continuado usando las levaduras del género *Saccharomyces* como producto de etanol. Esto se debe a las muchas características atractivas de las especies de *Saccharomyces* para procedimientos industriales, es decir, una alta tolerancia a los ácidos, el etanol y osmotolerancia, capacidad de crecimiento anaerobio y, por supuesto, alta capacidad fermentativa alcohólica. Especies de levadura preferidas como células hospedadoras incluyen *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* o *K. fragilis*.

20 Una célula de levadura puede ser una célula adecuada para la producción de etanol. Sin embargo, una célula de levadura puede ser adecuada para la producción de productos de fermentación distintos al etanol

25 Estos productos de fermentación no etanólicos incluyen cualquier producto químico a granel o puro que sea producible por un microorganismo eucariótico tal como una levadura o un hongo filamentoso.

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

Lignocelulosa

30 La lignocelulosa, que se puede considerar una materia prima renovable potencial, comprende generalmente los polisacáridos celulosa (glucanos) y hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algo de hemicelulosa puede estar presente como glucomanos, por ejemplo en materias primas derivadas de madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos en azúcares solubles, incluyendo tanto monómeros como multímeros, por ejemplo glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas se produce bajo la acción de diferentes enzimas que actúan conjuntamente.

40 Además, las pectinas y otras sustancias pécticas tales como arabinanos pueden constituir una proporción considerable de la masa seca de paredes celulares típicas procedentes de tejidos de plantas no leñosas (aproximadamente de un cuarto a la mitad de la masa seca pueden ser pectinas).

Pretratamiento

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

Hidrólisis enzimática

El material pretratado se somete comúnmente a hidrólisis enzimática para liberar azúcares que se pueden fermentar según la invención. Esto se puede ejecutar con métodos convencionales, p. ej. poniendo en contacto con celulasas, a modo de ejemplo celobiohidrolasa(s), endoglucanasa(s), beta-glucosidasa(s) y opcionalmente otras enzimas. La conversión con las celulasas se puede ejecutar a temperaturas ambiente o temperaturas superiores, con un tiempo de reacción para liberar suficientes cantidades de azúcar o azúcares. El resultado de la hidrólisis enzimática es un producto de hidrólisis que comprende azúcares C5/C6, denominado en la presente la composición sacárica.

La composición sacárica

La composición sacárica usada según la invención comprende glucosa y una o más pentosas, p. ej. arabinosa y/o xilosa. Se puede usar en la invención cualquier composición sacárica que cumpla esos criterios. Azúcares opcionales en la composición sacárica son galactosa y manosa. En una realización preferida, la composición sacárica es un hidrolizado de uno o más materiales lignocelulósicos. Lignocelulosa incluye en la presente hemicelulosa y partes de hemicelulosa de la biomasa. La lignocelulosa también incluye fracciones lignocelulósicas de biomasa. Materiales lignocelulósicos adecuados se pueden encontrar en la siguiente lista: preparación de huertos, chaparral, residuos de molienda, residuos de madera urbanos, residuos municipales, residuos de talas, aclarados forestales, cultivos madereros de rotación corta, residuos industriales, paja de trigo, paja de avena, paja de arroz, paja de cebada, paja de centeno, paja de lino, cáscaras de soja, cáscaras de arroz, paja de arroz, pienso de gluten de maíz, cáscaras de avena, caña de azúcar, rastrojos de maíz, tallos de maíz, mazorcas de maíz, cáscaras de maíz, pasto varilla, pasto plateado, sorgo dulce, tallos de colza, tallos de soja, bromo, zacate maicero, cola de zorro; pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos, cáscaras de semillas, residuos animales celulósicos, costes de césped, algodón, algas, árboles, madera blanda, madera dura, álamo, pino, matorrales, pastos, trigo, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, maíz, cáscaras de maíz, hobs de maíz, grano de maíz, fibra procedente de granos, productos y subproductos procedentes de molienda de granos en húmedo o en seco, residuos sólidos municipales, papel residual, residuos de jardines, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, papel residual, pasta papelera, residuos de fábricas de papel, ramas, arbustos, cañas, maíz, cáscaras de maíz, un cultivo energético, bosques, una fruta, una flor, un cereal, un pasto, un cultivo herbáceo, una hoja, corteza, una aguja, un tronco, una raíz, un pimpollo, un matorral, pasto varilla, un árbol, una hortaliza, piel de fruta, una vid, pulpa de remolacha azucarera, harinillas de trigo, cáscaras de avena, madera dura o blanda, material residual orgánico generado a partir de un procedimiento agrícola, residuos madereros forestales o una combinación de cualesquiera dos o más de los mismos.

Una visión general de algunas composiciones sacáricas adecuadas derivadas de lignocelulosa y la composición sacárica de sus hidrolizados se da en la tabla 1. Las lignocelulosas listadas incluyen: mazorcas de maíz, fibra de maíz, cáscaras de arroz, cáscaras de melón, pulpa de remolacha azucarera, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, madera, pasto y prensados de aceitunas.

Tabla 1: Visión general de composiciones sacáricas procedentes de materiales lignocelulósicos. Gal=galactosa, Xil=xilosa, Ara=arabinosa, Man=manosa, Glu=glutamato, Ram=ramnosa. Se da el porcentaje de galactosa (% Gal) y la fuente bibliográfica.

Material lignocelulósico	Gal	Xil	Ara	Man	Glu	Ram	Suma	% Gal.	Bibl.
Mazorca de maíz a	10	286	36		227	11	570	1,7	(1)
Mazorca de maíz b	131	228	160		144		663	19,8	(1)
Cáscaras de arroz a	9	122	24	18	234	10	417	2,2	(1)
Cáscaras de arroz b	8	120	28		209	12	378	2,2	(1)
Cáscaras de melón	6	120	11		208	16	361	1,7	(1)
Pulpa de remolacha azucarera	51	17	209	11	211	24	523	9,8	(2)
Paja de trigo Idaho	15	249	36		396		696	2,2	(3)
Fibra de maíz	36	176	113		372		697	5,2	(4)
Bagazo de caña	14	180	24	5	391		614	2,3	(5)
Rastrojos de maíz	19	209	29		370		626		(6)
Taraje (madera)	5	118	7	3	493		625	0,7	(7)
Eucalipto (madera)	22	105	8	3	445		583	3,8	(7)

Material lignocelulósico	Gal	Xil	Ara	Man	Glu	Ram	Suma	% Gal.	Bibl.
CWR (pasto)	8	165	33		340		546	1,4	(7)
JTW (pasto)	7	169	28		311		515	1,3	(7)
MSW	4	24	5	20	440		493	0,9	(7)
Alpiste	16	117	30	6	209	1	379	4,2	(8)
Semillas de alpiste	13	163	28	6	265	1	476	2,7	(9)
Residuo de prensado de aceitunas	15	111	24	8	329		487	3,1	(9)

5 Esta claro a partir de la tabla 1 que en estas lignocelulosas una gran cantidad de azúcar está presencia en la forma de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa. La conversión de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa en un producto de fermentación es así de gran importancia económica. También está presente manosa en algunos materiales lignocelulósicos, habitualmente en cantidades menores que los azúcares mencionados previamente. Por lo tanto, ventajosamente, también la manosa es convertida por la célula de levadura.

10 Se espera que las células de levadura de la presente invención se puedan manipular adicionalmente para alcanzar otras características deseables, o incluso rendimientos globales de etanol superiores.

15 La selección de células de levadura mejoradas al someter a pases a células de levadura sobre medio que contiene hidrolizado ha dado como resultado una levadura mejorada con velocidades de fermentación potenciadas. Usando las enseñanzas de la presente invención, se podrían alcanzar fácilmente estas cepas mejoradas.

Por material que contiene pentosa se entiende cualquier medio que comprenda pentosa, ya sea líquido o sólido. Materiales que contienen pentosa adecuados incluyen hidrolizados de polisacárido o biomasa lignocelulósica tal como cáscaras de maíz, madera, papel, subproductos agrícolas y similares.

20 Por un "hidrolizado", según se usa en la presente, se entiende un polisacárido que se ha despolimerizado a través de la adición de agua para formar azúcares mono- y oligosacáricos. Los hidrolizados se pueden producir mediante hidrólisis enzimática o ácida del material que contiene polisacáridos.

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

35 Fermentación

El procedimiento de fermentación puede ser un procedimiento de fermentación aerobia o anaerobia. Un procedimiento de fermentación anaerobia se define en la presente como un procedimiento de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que sustancialmente no se consume oxígeno, preferiblemente menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 1 mmol/l/h, más preferiblemente se consumen 0 mmol/l/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable) y en el que moléculas orgánicas sirven como donante de electrones aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en la glucolisis y la formación de biomasa no se puede oxidar mediante fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como un aceptor de electrones e hidrógeno, regenerando de ese modo NAD⁺.

45 Así, en un procedimiento de fermentación anaerobia, se usa piruvato como un aceptor de electrones (e hidrógeno) y se reduce hasta productos de fermentación tales como etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico un aminoácido y etileno.

50 El procedimiento de fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura que es óptima para la célula. Así, para la mayoría de las células hospedadoras de levadura o fúngicas, el procedimiento de fermentación se efectúa a una temperatura que es menor de aproximadamente 42°C, preferiblemente menor de aproximadamente 38°C. Para

células hospedadoras de levadura u hongo filamentosos, el procedimiento de fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura que es menor de aproximadamente 35, aproximadamente 33, aproximadamente 30 o aproximadamente 28°C y a una temperatura que es superior a aproximadamente 20, aproximadamente 22 o aproximadamente 25°C.

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

10 La invención también se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación.

15 El procedimiento de fermentación según la presente invención se puede realizar bajo condiciones aerobias y anaerobias. En una realización, el procedimiento se lleva a cabo bajo condiciones microaerófilas o con oxígeno limitado.

20 Un procedimiento de fermentación anaerobia se define en la presente como un procedimiento de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que sustancialmente no se consume oxígeno, preferiblemente menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 1 mmol/l/h, y en el que moléculas orgánicas sirven como donante y como aceptores de electrones.

25 Un procedimiento de fermentación con oxígeno limitado es un procedimiento en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno del gas al líquido. El grado de limitación de oxígeno está determinado por la cantidad y la composición del flujo gas entrante así como las propiedades de mezclado/transferencia de masa reales del equipo de fermentación usado. Preferiblemente, en un procedimiento bajo condiciones de oxígeno limitado, la velocidad de consumo de oxígeno es al menos aproximadamente 5,5, más preferiblemente al menos aproximadamente 6, tal como al menos 7 mmol/l/h. Un procedimiento de la invención puede comprender la recuperación del producto de fermentación.

30 En un procedimiento preferido la célula fermenta tanto la xilosa como la glucosa, preferiblemente simultáneamente, en cuyo caso preferiblemente se usa una célula que sea insensible a la represión de glucosa para evitar el crecimiento diaúxico. Además de una fuente de xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el ingrediente apropiado requerido para el crecimiento de la célula. Composiciones de medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras se conocen bien en la técnica.

35 Los procedimientos de fermentación se pueden llevar a cabo en modo discontinuo, semicontinuo o continuo. También se puede aplicar un procedimiento de hidrólisis y fermentación separadas (SHF) o un procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). También es posible una combinación de estos modos del procedimiento de fermentación para una productividad óptima. Estos procedimientos se describen posteriormente en la presente con más detalle.

Modo SSF

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

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

55 Concentración de producto en el modo SSF

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

El rendimiento máximo teórico (Yps máx en g de producto por gramo de glucosa) de un producto de fermentación se puede derivar de la bioquímica de libros de texto. Para el etanol, 1 mol de glucosa (180 g) da según la ruta de

fermentación por glucólisis normal en levadura 2 moles de etanol (=2x46 = 92 g de etanol. El rendimiento máximo teórico de etanol sobre glucosa es por lo tanto $92/180 = 0,511$ g de etanol/g de glucosa.

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

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

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

Modo de SSF

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

20 Según esto, la invención proporciona un método para la preparación de un producto de fermentación, método que comprende:

a. degradar lignocelulosa usando un método como el descrito en la presente; y

b. fermentar el material resultante,

25 para preparar de ese modo un Producto de fermentación.

Producto de fermentación

30 El Producto de fermentación de la invención puede ser cualquier producto útil. En una realización, es un producto seleccionado del grupo que consiste en etanol, n-butanol, isobutanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ácido itacónico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido adípico, un aminoácido, tal como lisina, metionina, triptófano, treonina y ácido aspártico, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico de β -lactama y una cefalosporina, vitaminas, productos farmacéuticos, complementos para piensos, productos químicos especiales, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles, incluyendo biocombustibles y biogás u otros polímeros orgánicos, y una enzima industrial, tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidorreductasas, una transferasa o una xilanasas.

35

Recuperación del producto de fermentación

40 Para la recuperación del producto de fermentation se usan tecnologías existentes. Para diferentes productos de fermentación, son apropiados diferentes procedimientos de recuperación. Métodos existentes para retirar etanol de mezclas acuosas usan comúnmente técnicas de fraccionación y adsorción. Por ejemplo, se puede usar un alambique para cerveza para procesar un producto fermentado, que contiene etanol en una mezcla acuosa, para producir un mezcla que contiene etanol enriquecido que a continuación se somete a fraccionación (p. ej., destilación fraccionada u otras técnicas similares). A continuación, las fracciones que contienen las concentraciones más altas de etanol se pueden hacer pasar a través de un adsorbente para retirar la mayoría, si no todo, del agua restante del etanol.

45

Los siguientes ejemplos no limitativos pretenden ser puramente ilustrativos.

Ejemplos

50 Cepas y mantenimiento. Para el almacenamiento de las cepas usadas en este estudio (Tabla 1), se realizaron cultivos en matraz agitado en medio complejo (YP), que consistía en 10 g l^{-1} de extracto de levadura (BD Difco) y 20 g l^{-1} de peptona (BD Difco), complementado bien con 2% de glucosa (YPD), 2% de etanol + 1,5% de glicerol (YP-EtOH/Glic) o 2% de arabinosa (YP-Ara). Los cultivos se incubaron a 30°C en un agitador orbital (200 rpm) hasta una fase de crecimiento estacionario. Después de la adición de 30% (v/v) de glicerol, las muestras procedentes de cultivos en matraz agitado se almacenaron en partes alícuotas de 2 ml a -80°C .

Cultivo en matraz agitado. El cultivo en matraces agitados se realizó a 30°C en medio sintético que contenía 2,3 g l⁻¹ de urea, 6,6 g l⁻¹ de K₂SO₄, 3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 g l⁻¹ de MgSO₄·7H₂O y elementos vestigiales (MYurea) [7]. Para el cultivo en matraz agitado, el pH del medio se ajustó hasta 4,7 con KOH 2 M antes de la esterilización. Después de la termoesterilización (121°C, 20 min), se añadieron una solución de vitaminas esterilizada en filtro [7] y se añadieron azúcares. Los cultivos en matraz agitado se prepararon al inocular 100 ml de medio que contenía el azúcar apropiado en un matraz agitado de 500 ml con un cultivo madre congelado, y se incubaron a 30°C en un agitador orbital (200 rpm).

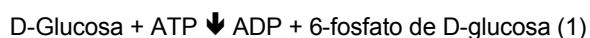
Cultivo discontinuo anaerobio. Se llevó a cabo un cultivo discontinuo anaerobio a 30°C en fermentadores de 2 litros (Applikon, Schiedam, Países Bajos) con un volumen de trabajo de 1 l. Los cultivos se realizaron en medio sintético que contenía 5 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 g l⁻¹ de MgSO₄·7H₂O y elementos vestigiales [7]. Después de la termoesterilización (121°C, 20 min.), el medio se complementó con 0,01 g l⁻¹ de ergosterol y 0,42 g l⁻¹ de Tween 80 disuelto en etanol [1,2], un antiespumante silicónico, elementos vestigiales, solución de vitaminas esterilizada con filtro [7] y la fuente de carbono apropiada. Los cultivos se agitaron a 800 rpm y se rociaron con 0,5 l min⁻¹ de nitrógeno gaseoso (<10 ppm de oxígeno) y se mantuvieron a pH 5,0 mediante la adición automática de KOH 2 M. Para minimizar la difusión de oxígeno, los fermentadores se equiparon con un tubo de Norprene (Cole Palmer Instrument Company, Vernon Hills, EE. UU. de A.). La ausencia de oxígeno se verificó con un electrodo de oxígeno (Applisens, Schiedam, Países Bajos). Los cultivos discontinuos se iniciaron mediante la inoculación con un cultivo en matraz agitado desarrollado glucosa de 100 ml.

Determinación de la velocidad de crecimiento. Para cultivos en matraz agitado, se elaboraron perfiles de crecimiento al medir la densidad óptica a 660 nm (OD₆₆₀) en el tiempo. Para cultivos anaerobios en fermentadores, se determinaron las velocidades de crecimiento específicas basándose en las concentraciones de CO₂ en el gas de escape. Las velocidades de crecimiento específicas se determinaron al ajustar puntos de datos con una curva exponencial.

Análisis de dióxido de carbono y metabolitos extracelulares. El gas de escape procedente de fermentadores anaerobios se enfrió en un condensador (2°C) y se secó con un secador Permapure tipo MD-110-48P-4 (Permapure, Toms River, EE. UU. de A.). Las concentraciones de dióxido de carbono se determinaron con un analizador NGA 2000 (Rosemount Analytical, Orrville, EE. UU. de A.). Los caudales del gas de escape y las velocidades de producción de dióxido de carbono específicas se determinaron como se describe previamente [6,8].

Se analizaron glucosa, arabinosa, acetato, lactato, succinato, glicerol y etanol mediante HPLC usando una HPLC Waters Alliance 2690 (Waters, Milford, EE. UU. de A.) complementada con una columna BioRad HPX 87H (BioRad, Hercules, EE. UU. de A.), un detector del índice de refracción Waters 2410 y un detector UV Waters 2487. La columna se eluyó a 60°C con 0,5 g l⁻¹ de ácido sulfúrico a un caudal de 0,6 ml min⁻¹.

Determinación de la actividad de hexocinasa. La actividad de hexocinasa en extractos celulares de las cepas usadas en este estudio se determina al medir la conversión de glucosa en 6-fosfato de glucosa (reacción 1), usando una reacción enzimática acoplada (reacción 2) que convierte el 6-fosfato de glucosa formado en 6-fosfogluconato mediante la enzima 6-fosfato de glucosa deshidrogenasa. La velocidad de NADPH formado en esta reacción de acoplamiento es igual a la actividad de hexocinasa y se determina al medir la absorbancia a 340 nm.



Ejemplo 1

Eliminaciones de genes. Las eliminaciones de genes de la presente se alcanzaron mediante la integración de un casete de resistencia a G418 que reemplaza al gen diana. Para la eliminación de *HXK2*, *HXK1* y *GLK1*, el casete KanMX de pUG6 se amplificó mediante PCR [4], usando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en este estudio para la construcción de eliminaciones de genes y propósitos de diagnóstico relacionados. Un casete de eliminación del gen KanMX se obtuvo mediante PCR al usar combinaciones de los oligonucleótidos DisA y DisB. Los genes se perturbaron mediante recombinación homóloga entre el gen diana y el casete de eliminación del gen KanMX. Los sitios de recombinación se indican mediante las regiones subrayadas en los oligonucleótidos. La eliminación o perturbación se confirmó mediante PCR usando los cebadores de diagnóstico KanA y KanB combinados con los cebadores de diagnóstico FW y RV correspondientes con el gen diana (p. ej. KanA combinado con HXK2-FW y KanB combinado con HXK2-RV).

ES 2 629 252 T3

Nombre	Secuencia de ADN 5'-3'
Oligonucleótidos usados para la construcción de casetes de perturbación de genes	
HXK2-disA	<u>GTTGTAGGAATATAATTCTCCACACATAATAAGTACGCTAATTCAGCT</u> GAAGCTTCGTACGC
HXK2-disB	<u>AAAAGGGCACCTTCTTGTGTTCAAACCTTAATTTACAAATTAAGTGCA</u> TAGGCCACTAGTGGATCTG
HXK1-disA	<u>TTTCTTTTAATCAAACCTCACCCAAACAACCTCAATTAGAATACTGCAGC</u> TGAAGCTTCGTACGC
HXK1-disB	<u>GAATAATAATATTAAGGGAGGGAAAAACACATTTATATTTTCATTACAG</u> CATAGGCCACTAGTGGATCTG
GLK1-disA	<u>CTCGGACAAAGGTCTTCTATGATTCCGGCGTTCGTCACCGGGTCC</u> AGCTGAAGCTTCGTACGC
GLK1-disB	<u>TAAAGGAGAGAAGATGGTAAGTACGGTGGGATACGTACACAAACATA</u> GGCCACTAGTGGATCTG
Oligonucleótidos usados con propósitos de diagnóstico	
KanA	CGCACGTCAAGACTGTCAAG
KanB	TCGTATGTGAATGCTGGTCG
HXK2-FW	TTGCCACTGTCTTATCTAC
HXK2-RV	CCGTTTCGTTCCAGAATTATC
HXK1-FW	CCTTAGGACCGTTGAGAGGAATAG
HXK1-RV	TCCCGGAGAACAAAGTAAGTGG
GLK1-FW	AAAAACGGGAAATAACAATAACGAC
GLK1-RV	TGCGATCTTATTAGTGTGTGACATT

5 Después de la purificación de los productos de PCR (GenElute PCR Clean-up Kit, Sigma, Steinheim, Alemania), los cultivos durante la noche se transformaron [3] con el casete de perturbación génica. Se seleccionaron células transformadas sobre agar de YPD que contenía 100 µg ml⁻¹ de G418 (InvivoGen, San Diego, EE. UU. de A.). La integración correcta del casete KanMX se verificó mediante PCR sobre colonias individuales usando oligonucleótidos de diagnóstico que se unen en el casete KanMX y regiones aguas arriba y aguas abajo del gen diana (Tabla 1).

10 Para eliminaciones de múltiples genes, el marcador KanMX se rescató antes de la eliminación del siguiente gen. A este fin, las células se transformaron con pSH65, que expresa la Cre-recombinasa inducible y que soporta el gen de resistencia a fleomicina ble^r [5]. Las células transformadas se extendieron sobre placas de YPD que contenían fleomicina y se incubaron a 30°C hasta que aparecían colonias. YP líquido-galactosa que contenía 7,5 µg/ml de fleomicina (InvivoGen, San Diego, EE. UU. de A.) se inoculó con varias colonias resistentes a fleomicina, se incubó durante la noche a 30°C para la inducción de la Cre recombinasa y se transfirió a YPD sólido con fleomicina. La retirada del casete KanMX mediante la Cre-recombinasa se confirmó mediante cultivo en placa de réplica de

5 colonias de levadura resistentes a fleomicina sobre YPD y YPD-G418 y mediante PCR de diagnóstico sobre colonias individuales que habían perdido la resistencia a G418. Posteriormente, la pérdida de pSH65 se alcanzó al hacer crecer células no selectivamente durante 5-10 generaciones en YPD sin fleomicina, después de lo cual se confirmó la resistencia a fleomicina mediante cultivo en placas de réplica de colonias individuales sobre YPD sólido con y sin fleomicina. La eliminación posterior de *HXK2*, *HXK1* y *GLK1* y la retirada del gen KanMX después de cada eliminación daba como resultado las cepas IMK306, IMK307, IMK311, IMK312 y IMK318 (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de *S. cerevisiae* construidas y usadas en la presente.

Cepa	Genotipo / características pertinentes
DS62504	MAT a MAL2-8c SUC2 ygr059w::{\TDH3p-araA; ENO1p-araB PGI1p-araD} gre3::{\TPI1p-TAL1; ADH1p-TKL1; PGI1p-RPE1; ENO1p-RK11} yel023c::{\TPI1 p-XylA; TDH1p-XKS1}
IMK306	Como DS62504; $\Delta h x k 2::L o x P$ -KanMX-LoxP
IMK307	Como DS62504; $\Delta h x k 2::L o x P$
IMK311	Como DS62504; $\Delta h x k 2::L o x P$ $\Delta h x k 1::L o x P$ -KanMX-LoxP
IMK312	Como DS62504; $\Delta h x k 2::L o x P$ $\Delta h x k 1::L o x P$
IMK318	Como DS62504; $\Delta h x k 2::L o x P$ $\Delta h x k 1::L o x P$ $g l k 1::L o x P$ -KanMX-LoxP
IMW017	Como DS62504; $\Delta h x k 2::L o x P$ $\Delta h x k 1::L o x P$ $g l k 1::L o x P$ -KanMX-LoxP; aislado de una sola colonia derivado de IMK318, seleccionado para el consumo de arabinosa insensible a glucosa; consumo simultáneo de glucosa y arabinosa
IMW018	Como DS62504; $\Delta h x k 2::L o x P$ $\Delta h x k 1::L o x P$ $g l k 1::L o x P$ -KanMX-LoxP; aislado de una sola colonia derivado de IMK318, seleccionado para el consumo de arabinosa insensible a glucosa; consumo de arabinosa en presencia de >2% (p/v) de glucosa

10 El efecto de la eliminación de *h x k 2* y *h x k 2 h x k 1* sobre el consumo de glucosa y arabinosa. Para determinar el efecto de la eliminación de *H X K 2* y *H X K 1* sobre el consumo de glucosa y arabinosa, las cepas DS62504, IMK307 (*h x k 2* Δ) y IMK311/IMK312 (*h x k 2* Δ *h x k 1* Δ) se cultivaron tanto en matraces agitados (Fig 1) como en fermentadores anaerobios (Fig 2) a 30°C en MY complementado con una mezcla de 2% de arabinosa y 2% de glucosa.

15 Los cultivos en matraz agitado se iniciaron a una OD660 inicial de aproximadamente 0,05 mediante inoculación con cultivos en matraz agitado desarrollados en MY-glc. La cepa DS62504 (Fig 1) consumía glucosa en 21 horas y al agotarse la glucosa, se iniciaba el consumo de arabinosa. Ambos azúcares se consumían en un tiempo total de más de 50 horas. En el cultivo de la cepa IMK307 (Fig 1), la glucosa se consumía totalmente en 25 horas y la arabinosa se agotaba en menos de 15 horas después de eso. IMK307 global demostraba una reducción de al menos 20% en el tiempo de fermentación total en comparación con DS62504. La cepa IMK311 (Fig 1) consumía 2% de glucosa en aproximadamente 30 horas. Con todavía aproximadamente 10 mM de glucosa restante en el cultivo, se observaba consumo de arabinosa. La arabinosa se completaba en 48 horas. Aunque más lentamente que IMK307, el tiempo de fermentación global de IMK311 todavía era más corto que el de DS62504.

20 Los cultivos anaerobios (Fig 2) se iniciaron con una OD660 inicial de aproximadamente 1 mediante inoculación con cultivos en matraz agitado desarrollados en MY-glc. Basándose en el perfil de producción de CO₂, se podía deducir que la cepa DS64205 consumía completamente la glucosa en menos de 15 horas. La velocidad de crecimiento específica durante el consumo de glucosa era 0,29 h⁻¹. Sin embargo, la arabinosa se consumía a una velocidad mucho menor. Después de 80 horas, aproximadamente 90% de la arabinosa todavía estaba presentes en el caldo de fermentación. El consumo de glucosa para la cepa IMK307 (*h x k 2* Δ) era más lento. Tanto el perfil de producción de CO₂ como las medidas de glucosa indicaban que toda la glucosa se consumía en 20 horas. La velocidad de crecimiento específica durante el consumo de glucosa era 0,20 h⁻¹. El consumo de arabinosa se iniciaba al agotarse la glucosa y 92% de la arabinosa se consumía en 66 horas, lo que es una mejora clara si se compara con la cepa DS62504. La eliminación de *H X K 1* adicional a *H X K 2* (cepa IMK312) tenía un efecto rigurosos sobre la velocidad de crecimiento específica sobre glucosa. La velocidad de crecimiento 0,05 h⁻¹ para la cepa IMK312 era 75% inferior que la de la cepa IMK307. La glucosa se agotaba en 46 horas. Dentro de estas 46 horas, se consumía aproximadamente 10% del total de 132 mM de arabinosa. La arabinosa se consumía completamente en menos de 112 horas.

40 Ejemplo 2

Selección de crecimiento de IMK318 sobre arabinosa en presencia de glucosa. Se confirmaba mediante 450 horas de cultivo en matraces agitados sobre glucosa que la cepa de eliminación de hexocinasa/glucocinasa IMK318 (*h x k 1* Δ *h x k 2* Δ *g l k 1* Δ) es incapaz de crecer sobre glucosa sola. Por lo tanto, la cepa se cultivó en YP-EtOH/Glyc y

posteriormente se almacenó a -80°C después de la adición de glicerol. Posteriormente, se cultivó IMK318 en 100 ml de MY que contenía 2% de arabinosa. Después de 3 días, con una OD660 de aproximadamente 1, se transfirieron 2 ml del cultivo a 100 ml de MY reciente que contenía 2% de arabinosa. Después de aproximadamente 12 días, la OD660 del cultivo era >5 y las muestras se almacenaron a -80°C como reservas de glicerol. La cepa IMK318 se cultivó a 30°C durante varios días en MY-ara. A una OD660 de aproximadamente 5, se transfirieron 2 ml del cultivo a 6 matraces agitados separados que contenían 100 ml de MYurea complementado con 2% de arabinosa y concentraciones variables de glucosa: 0, 0,11, 0,23, 0,65, 1,3 y 2,5 (p/v) %. El crecimiento de estos 6 cultivos paralelos se registró mediante medidas de la OD660 (Fig 3). Se observó que, en presencia de glucosa, el crecimiento se retrasa. Una cantidad creciente de glucosa daba como resultado un crecimiento sobre arabinosa crecientemente retrasado. Dos de estos cultivos paralelos (Línea A que empezaba con 0,65 p/v% de glucosa; Línea B que empezaba con 2,5 p/v% de glucosa) se transfirieron en serie a 100 ml de MY complementado con arabinosa y glucosa según los esquema de transferencia mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Representación esquemática de cultivos en matraz agitado (SF) transferidos en serie de la cepa IMK318 en MYurea con concentraciones de arabinosa (ara) y glucosa (glc) como las indicadas. Las series de transferencia A y B daban como resultado finalmente aislados de una sola colonia IMW018 y IMW017, respectivamente.

Serie	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7	Aislado de una sola colonia
A	2% Ara	2% Ara	2% Ara	2% Ara	2% Ara	2% Ara	2% Ara	IMW018
	0,65 Glc	1% Glc	2,5% Glc	2% Glc	2% Glc	2% Glc	2% Glc	
B	2% Ara	2% Ara	2% Ara					IMW017
	2,5% Glc	2% Glc	2% Glc					

En la serie A, donde los cultivos se transferían a medio con concentraciones crecientes de glucosa (Tabla 3), la arabinosa se consume completamente mientras se consumía menos de 10% de la glucosa (Figura 4). A partir de SF7, las muestras se extendieron sobre YP-ara sólido complementado con $100\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ de G418 y se incubaron a 30°C hasta que aparecían las colonias. Las colonias separadas se transfirieron a YP-ara sólido. Se cultivaron aislados de una sola colonia en YP-ara y se almacenaron a -80°C . Se probaron dos aislados de una sola colonia de esta serie de matraces agitados transferidos en serie y se encontraron cualitativamente similares al cultivo mixto. Uno de estos aislados se denominó cepa IMW018.

En la serie B (Tabla 3), se transfirieron cultivos en matraz agitado en medio MY con concentraciones fijas de 2% de arabinosa y 2% de glucosa (Figura 5). Sorprendentemente, se observó el consumo simultáneo de arabinosa y glucosa después de la primera transferencia (SF1 \rightarrow SF2). A partir de SF3, las muestras se extendieron sobre YP-ara sólido complementado con $100\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ de G418 y se incubaron a 30°C hasta que aparecían colonias. Las colonias separadas se transfirieron a YP-ara sólido. Los aislados de una sola colonia se cultivaron en YP-ara y se almacenaron a -80°C como reservas de glicerol. Se probaron dos aislados de una sola colonia de esta serie de matraces agitados transferidos en serie y se encontraron cualitativamente similares al cultivo mixto. Uno de estos aislados se denominó cepa IMW017.

Se probó el consumo de glucosa y arabinosa de ambas cepas de aislamiento de una sola colonia IMW017 y IMW018 en cultivos en matraz agitado (Figuras 4 y 5). Los aislados de una sola colonia exhibían perfiles de concentración de glucosa y arabinosa que eran similares a los cultivos en matraz agitado transferidos en serie de los que se originan. De forma interesante, los regímenes de concentración de glucosa aplicados en esta estrategia de manipulación evolutiva basada en la cepa de eliminación de hexocinasa/glucocinasa IMK318 (*hxx1Δ hxx2Δ glk1Δ*) daban como resultado dos fenotipos diferentes: (i) Consumo de arabinosa insensible a glucosa por la cepa IMW018, y (ii) consumo simultáneo de arabinosa y glucosa por la cepa IMW017.

Ejemplo 3

Cofermentación anaerobia de arabinosa y glucosa. La cepa IMW017 se cultivó anaerobiamente en una mezcla de glucosa y arabinosa, usando una disposición de fermentador discontinuo secuencial. Se realizaron tres lotes consecutivos en la mezcla de glucosa/arabinosa (Fig. 6). En cada lote, la glucosa y la arabinosa se consumían simultáneamente y se fermentó en etanol. Deducido del perfil de producción de CO_2 , se observó que la velocidad de crecimiento específica sobre la mezcla de glucosa/arabinosa se incrementaba desde $0,05\ \text{h}^{-1}$ en el primer lote hasta $0,07\ \text{h}^{-1}$ en el tercer lote.

Durante las fermentaciones discontinuas consecutivas adicionales, la velocidad de crecimiento se incrementa aún más. Una cepa de aislamiento de una sola colonia tomada del lote final exhibe consumo simultáneo de glucosa y arabinosa a una velocidades de consumo específicas incrementadas en comparación con IMW017.

Ejemplo 4

Actividades de hexocinasa. Se determinan las actividades de hexocinasa en extractos celulares de las cepas DS62504, IMK307, IMK312, IMK318, IMW017 y IMW018. La actividad de hexocinasa en extractos celulares de IMK307 (*hxx2Δ*) son inferiores que la de la cepa DS62504. La actividad de hexocinasa de IMK312 (*hxx2Δ hxx1Δ*) son inferiores que la de IMK307, mientras que IMK318 (*hxx2Δ hxx1Δ glk1Δ*) no exhibe / exhibe la mínima actividad de hexocinasa. Las actividades de hexocinasa en la cepa IMW018 son similares a las actividades de hexocinasa observadas para IMK318, mientras que IMW017 tiene actividades de hexocinasa superiores que IMK318.

Ejemplo 5

Identificación de una hexocinasa desconocida en IMW017. Basándose en la actividad de hexocinasa medida en las cepas *hxx1 hxx2 glk1* evolucionadas, se espera que otro gen con el potencial de codificar una cinasa de azúcar presente en el genoma bien se haya hecho activo o bien haya cambiado su especificidad de sustrato para glucosa. El gen que codifica esta actividad se identifica por análisis genómico. La eliminación adicional de este gen da como resultado una disminución de la actividad de hexocinasa. Esta cepa con inactivación cuádruple proporciona una plataforma aún más fuerte para la manipulación evolutiva del consumo de arabinosa en presencia de glucosa.

Ejemplo 6

Reintroducción de la actividad de hexocinasa o glucocinasa en IMK318. Para restaurar el crecimiento sobre glucosa, bien *HXX1*, bien *HXX2* o bien *GLK1* se reintroduce en IMK318. Las medidas de la actividad muestran que la reintroducción de uno de estos genes en IMK318 da como resultado una actividad incrementada de hexo/glucocinasa. Se restaura el crecimiento sobre glucosa como la única fuente de carbono.

Ejemplo 7

Reintroducción de la actividad de hexocinasa o glucocinasa en IMW018. Las medidas de la actividad muestran que la reintroducción bien de *HXX1*, bien de *HXX2* o bien de *GLK1* en IMW018 da como resultado una actividad incrementada de hexo/glucocinasa en comparación con la cepa IMW018. Se restaura el crecimiento sobre glucosa como la única fuente de carbono. La reintroducción bien de *HXX1*, bien de *HXX2* o bien de *GLK1* da como resultado el crecimiento tanto sobre glucosa como sobre arabinosa como la única fuente de carbono. La cepa resultante crece en una mezcla de glucosa y arabinosa, exhibiendo consumo simultáneo de glucosa y arabinosa.

Ejemplo 8

Identificación de mutaciones subyacentes del fenotipo insensible a glucosa de IMW017 y IMW018. Se espera que el fenotipo insensible a glucosa de las cepas IMW017 y IMW018 se pueda explicar por mutaciones que se han reunido durante el crecimiento selectivo de la cepa IMK318 en medio que contiene glucosa y arabinosa. Para identificar estas mutaciones, se someten a secuenciación los genomas de las cepas IMK318, IMW017 y IMW018. Al comparar las secuencias genómicas de IMW017 frente a IMK318 y IMW018 frente a IMK318, se identifican modificaciones genómicas, como p. ej. polimorfismos de un solo nucleótido. La introducción de estos polimorfismos de un solo nucleótido en DS62504 da como resultado fenotipos de los que el crecimiento sobre arabinosa es insensible a glucosa.

Ejemplo 9

Eliminación de *GAL1*. Otro enfoque para determinar la proteína o las proteínas responsables de la restante actividad de hexocinasa es eliminar genes que codifican potencialmente actividad de hexocinasa en la cepa *hxx1 hxx2 glk1*. A este fin, el gen *GAL1* se elimina en la cepa *hxx1 hxx2 glk1*. La cepa resultante muestra una actividad de hexocinasa inferior que la cepa *hxx1 hxx2 glk1* parental o muestra una capacidad disminuida de crecer sobre glucosa como la única fuente de carbono en comparación con la cepa *hxx1 hxx2 glk1* parental. Esta cepa con inactivación cuádruple proporciona una plataforma aún más fuerte para la manipulación evolutiva del consumo de arabinosa en presencia de glucosa.

Ejemplo 10

Eliminación de *YDR516c*. Otro enfoque para determinar la proteína o las proteínas responsables de la restante actividad de hexocinasa es eliminar genes que codifican potencialmente actividad de hexocinasa en la cepa *hxx1 hxx2 glk1*. A este fin, el gen *YDR516c* se elimina en la cepa *hxx1 hxx2 glk1*. La cepa resultante muestra una actividad de hexocinasa inferior que la cepa *hxx1 hxx2 glk1* parental o muestra una capacidad disminuida para

crecer sobre glucosa como la única fuente de carbono en comparación con la cepa *hxx1 hxx2 glk1* parental. Esta cepa con inactivación cuádruple proporciona una plataforma aún más fuerte para la manipulación evolutiva del consumo de arabinosa en presencia de glucosa.

Ejemplo 11

- 5 Eliminación de *YLR446w*. Otro enfoque para determinar la proteína o las proteínas responsables de la restante actividad de hexocinasa es eliminar genes que codifican potencialmente actividad de hexocinasa en la cepa *hxx1 hxx2 glk1*. A este fin, el gen *YLR446w* se elimina en la cepa *hxx1 hxx2 glk1*. La cepa resultante muestra una actividad de hexocinasa inferior que la cepa *hxx1 hxx2 glk1* parental o muestra una capacidad disminuida para crecer sobre glucosa como la única fuente de carbono en comparación con la cepa *hxx1 hxx2 glk1* parental. Esta cepa con inactivación cuádruple proporciona una plataforma aún más fuerte para la manipulación evolutiva del consumo de arabinosa en presencia de glucosa.

Ejemplo 12

- 15 Cofermentación anaerobia de arabinosa y glucosa. Para mejorar el consumo simultáneo de glucosa y arabinosa de la cepa IMW017, la cepa IMW017 se cultivó anaerobiamente en MY complementado con una mezcla de 20 g/litro de glucosa y 20 g/litro de arabinosa, usando una disposición de fermentador discontinuo secuencial. Inicialmente, se realizaron cuatro lotes consecutivos en la mezcla de glucosa/arabinosa. En cada lote, la glucosa y la arabinosa se consumían simultáneamente y se fermentó en etanol (Figura 6, ejemplo 3). Deducido del perfil de producción de CO₂, se observó que la velocidad de crecimiento específica sobre la mezcla de glucosa/arabinosa se incrementó desde 0,05 h⁻¹ en el primer lote hasta 0,06 h⁻¹ en el cuarto lote. Después del cuarto lote, se realizaron cultivos discontinuos consecutivos bien en mezclas de glucosa y arabinosa (lotes nº 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 y 39) o bien solamente en arabinosa (lotes nº 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40). Después de 19 y 21 lotes en MY-arabinosa y MY-glucosa/arabinosa, respectivamente, la velocidad de crecimiento anaerobio se incrementaba hasta 0,09 h⁻¹ sobre arabinosa como la única fuente de carbono y 0,10 h⁻¹ sobre la mezcla de glucosa/arabinosa (Figura 7). La comparación de los perfiles de producción de CO₂ de los cultivos discontinuos individuales muestra que el régimen discontinuo repetido ha dado como resultado una disminución en el tiempo de fermentación bien solamente para arabinosa o bien para la mezcla de glucosa/arabinosa desde aproximadamente 120 horas hasta aproximadamente 80 horas, suponiendo un tamaño de inóculo inicial igual para cada lote (Figura 8). El único pico de producción de CO₂ que se observaba para los cultivos discontinuos en la mezcla de glucosa/arabinosa indica que la glucosa y la arabinosa se consumen simultáneamente, en vez de secuencialmente (Figura 8 y 9).

Ejemplo 13

- 35 Actividades de hexocinasa. Las actividades de hexocinasa de las cepas DS62504, IMK307, IMK312, IMK318, IMW017 y IMW018 se determinaron en extractos celulares de cultivos en matraz agitado desarrollados en YP complementado con arabinosa. La mezcla de reacción de hexocinasa consistía en 50 mM de imidazol-HCl, pH 7,6, 1 mM de NADP⁺, 10 mM de MgCl₂, 2 U de 6-fosfato de glucosa deshidrogenasa, 10 mM de D-glucosa y extracto celular. La reacción se inició mediante la adición de 1 mM de ATP y la formación de NADPH se determinó al medir la absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm. La actividad de hexocinasa en extractos celulares de las cepas DS62504 y IMK307 (*hxx2Δ*) eran 1,2 y 1,3 μmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, respectivamente (Figura 10). La actividad de hexocinasa de 0,4 μmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína en extractos celulares de IMK312 (*hxx2Δ hxx1Δ*) era inferior que la de IMK307. Las cepas IMK318 y IMW018 (*hxx2Δ hxx1Δ glk1Δ*) exhibían una actividad de hexocinasa de menos de 0,02 μmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. Se esperaba que la cepa IMW017, que es capaz de consumir glucosa a pesar de las eliminaciones *hxx2 hxx1* y *glk1* triples, tuviera una actividad de hexocinasa superior en comparación con la cepa IMK318 y IMW018, que no son capaces de consumir glucosa. La actividad de hexocinasa para la cepa IMW017 también era menor de 0,02 μmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína bajo las condiciones de ensayo.

Ejemplo 14

- 50 Identificación de *GAL1* como una hexocinasa en IMW017. Basándose en experimentos de crecimiento de la cepa *hxx1Δ hxx2Δ glk1Δ* evolucionada IMW017 sobre mezclas de glucosa y arabinosa, se esperaba otro gen con el potencial de codificar una cinasa de azúcar presente en el genoma bien se hubiera hecho activa o bien hubiera cambiado su especificidad al sustrato hacia glucosa. Para investigar si la actividad de hexocinasa desconocida era codificada por *GAL1*, el gen *GAL1* se eliminó en IMW017. Después de la retirada del casete KanMX del locus *glk1* usando pSH65 (véase el ejemplo 1), la eliminación de *GAL1* se alcanzó mediante la integración de un casete de resistencia a G418 que se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos GAL1-DisA y GAL1-DisB (Tabla 5). Las células transformadas se seleccionaron sobre YP-agar que contiene 100 μg ml⁻¹ de G418 (InvivoGen, San Diego, EE. UU. de A.) y 1,5% (p/v) de etanol y 1,5% (p/v) de glicerol como fuente de carbono. La integración correcta del

casete KanMX se verificó mediante PCR sobre colonias individuales usando combinaciones de los oligonucleótidos de diagnóstico GAL1-FW2 / KanA y GAL1-RV2 / KanB. (Tabla 4). La eliminación de *GAL1* en la cepa resultante IMW023 se confirmó por la incapacidad para crecer sobre galactosa como la única fuente de carbono.

- 5 De forma interesante, IMW023 no era capaz de usar glucosa como fuente de carbono, indicando que GAL1 era responsable de la actividad de hexocinasa desconocida en su cepa *hxx1Δ hxx2Δ glk1Δ* parental IMW017. Durante un cultivo en matraz agitado en una mezcla de glucosa y arabinosa, IMW023 no consumía glucosa mientras que se consumía arabinosa (Figura 11).
- 10 Tabla 5. Oligonucleótidos usados en este estudio para la eliminación de *GAL1* y propósitos de diagnóstico relacionados. Un casete de eliminación del gen KanMX se obtuvo mediante PCR al usar combinaciones de los oligonucleótidos GAL1-DisA y GAL1-DisB. GAL1 era perturbado por recombinación de homólogos entre el gen diana y el casete de eliminación del gen KanMX. Los sitios de recombinación están indicados por las regiones subrayadas en los oligonucleótidos. La eliminación o perturbación se confirmó mediante PCR usando los cebadores de diagnóstico KanA y KanB combinados con los cebadores de diagnóstico FW y RV correspondientes con el gen diana.
- 15

GAL 1-DisA	<u>TAATATACCTCTATACTTTAACGTC</u> AAGGAGAAAAAACTAT AATGCAGCTGAAGCTTCGTACGC
GAL 1-DisB	AATGAGAAGTTGTTCTGAACAAAGTAAAAAAAAGAAGTATA <u>CTTACATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
Kan A	CGCACGTCAAGACTGTCAAG
Kan B	TCGTATGTGAATGCTGGTGC
GAL 1-FW2	ATGGCATTATACTCCTGCTAGAAAG
GAL 1-RV2	AAAGGATGGCAGAGCATGTTATCG

Ejemplo 15

- 20 Hacia la fermentación anaerobia de arabinosa en presencia de glucosa. Puesto que se encontró que GAL1p en IMW017 también exhibe actividad de hexocinasa, la cepa *hxx1Δ hxx2Δ glk1Δ gal1Δ* IMW023 proporciona una plataforma más sólida para mejorar el consumo de arabinosa en presencia de glucosa mediante manipulación evolutiva, sin que se consuma glucosa. Para seleccionar un consumo de arabinosa mejorado en presencia de glucosa en el medio, la cepa IMW023 se cultivó en cultivos en matraz agitado mediante la transferencia en serie en medio MY complementado con 2% de arabinosa y 2% de glucosa. El crecimiento se verificó mediante medidas de OD660 y las velocidades de crecimiento específicas se estimaron bien a partir de 2 o bien a partir de 3 medidas de OD660 por cultivo. Las concentraciones de glucosa y arabinosa se determinaron mediante análisis de HPLC. Después de 24 transferencias en serie sobre las mezclas de arabinosa/glucosa en 63 días, el cultivo transferido de la cepa IMW023 todavía era capaz de crecer sobre arabinosa en presencia de 2% de glucosa, sin consumir glucosa (Figura 12). La velocidad de crecimiento específica sobre arabinosa se incrementaba desde aproximadamente 0,06 h⁻¹ hasta aproximadamente 0,11 h⁻¹ (Figura 13).
- 25
- 30

- Para seleccionar células que sean capaces de consumir arabinosa en presencia de glucosa bajo condiciones anaerobias, y para mejorar adicionalmente el consumo de arabinosa en presencia de glucosa, la transferencia secuencial de la cepa IMW023 en medio MY complementado con 2% de arabinosa y 2% de glucosa se continuó en una disposición de fermentación discontinua secuencial anaerobio. Para esto, se usó como inóculo el cultivo en matraz agitado final del cultivo transferido en serie (SF24) de la cepa IMW023. En las primeras 1.000 horas de cultivo, solo se observaba un incremento en la producción de CO₂ cuando se suministraba aire al espacio libre del fermentador en lugar de nitrógeno gaseoso (Figura 14). Después de aproximadamente 1.000 horas de cultivo durante el cuarto lote, se observaba un incremento de las concentraciones de CO₂ en el gas de escape. Deducido del perfil de producción de CO₂, este primer lote de crecimiento anaerobio exhibía una velocidad de crecimiento específica de aproximadamente 0,03 h⁻¹. Después de otras diez transferencias, la velocidad de crecimiento específica se incrementaba hasta aproximadamente 0,06 h⁻¹ (Figura 14). Durante los cultivos discontinuos transferidos secuencialmente, se consumía arabinosa mientras que no se consumía glucosa (Figura 15). Los perfiles
- 35
- 40

de producción de CO₂ de los cultivos discontinuos individuales muestran que la velocidad de producción de CO₂, y así la velocidad de consumo de arabinosa, se ha incrementado durante las transferencias secuenciales, que ha dado como resultado una disminución del tiempo de fermentación necesario para consumir completamente arabinosa (Figura 16).

5 Un aislado de una sola colonia tomado del lote final, denominado cepa IMW058, exhibe un incremento en las velocidades de consumo de arabinosa en presencia de glucosa en comparación con IMW023.

Ejemplo 16

10 Reintroducción de la actividad de hexocinasa o glucocinasa en IMW018. La reintroducción bien de *HXK1*, bien de *HXK2* o bien de *GLK1* en la cepa IMW018 se realizó para restaurar el crecimiento sobre glucosa. Para esto, *HXK2*, *HXK1* y *GLK1* se amplificaron mediante PCR usando las combinaciones de oligonucleótidos HXK2FW / HXK2RV, HXK1FW / HXK1RV y GLK1 FW/GLK1RV, usando ADN genómico de *S. cerevisiae* CENPK113-7D como una plantilla. Después de la purificación de los productos de PCR (GenElute PCR Clean-up Kit, Sigma, Steinheim, Alemania), un cultivo durante la noche de IMW018 se transformó (Gietz y Woods 2002) con los productos de PCR. Se seleccionaron células transformadas con respecto al crecimiento sobre glucosa sobre MY-agar que contenía 2% de glucosa. La integración correcta de *HXK2*, *HXK1* y *GLK1* mediante recombinación homóloga en su locus original se verificó mediante PCR sobre colonias individuales usando los pares de cebadores de diagnóstico (Tabla 6).

20 Las cepas resultantes IMW024 (*HXK2*), IMW025 (*HXK1*) y IMW047 (*GLK1*) se cultivaron con una OD660 inicial de 0,05 ± 0,01 en matraces agitados a 30°C en medio de MY-urea (pH 4,7) complementado con 2% de glucosa y 2% de arabinosa, usando precultivos desarrollados sobre glucosa. Por comparación, las cepas DS62504, IMK307 y IMK311 se cultivaron bajo las mismas condiciones. El crecimiento y el consumo de azúcar se verificó durante 69 horas. Las cepas IMW024, IMW025 y IMW047 eran todas capaces de utilizar tanto glucosa como arabinosa (Figura 17). La reintroducción de *GLK1* en IMW018 (IMW047) daba como resultado un consumo rápido de glucosa y arabinosa. La arabinosa y la glucosa se terminaron en 43 horas de cultivo, que es similar a lo que se observa para IMK307 (*hvk2Δ*) y IMK311 (*hvk1Δ hvk2Δ*). El consumo de arabinosa observado para IMW024 (*HXK2*) y IMW025 (*HXK1*) era más lento que para IMK307 y IMK311, sin embargo más rápido que para la cepa parental DS62504 sin las eliminaciones *HXK/GLK* (Figura 17 (a)). El consumo simultáneo de arabinosa y glucosa solo se observaba para la cepa IMW047 (Figura 18). Antes de que la glucosa se agotara a las 22 horas, se consumía aproximadamente 7% de la arabinosa. A las 25 horas, cuando la glucosa se consumía completamente, se utilizaba 19% de la arabinosa.

35 Tabla 6. Oligonucleótidos usados en este estudio para la amplificación de *HXK2*, *HXK1* y *GLK1*. La integración de estos productos de PCR en su locus original se verificó mediante PCR usando cebadores de diagnóstico de los que sus sitios de renaturalización se sitúan en el inserto y en las regiones de flanqueo del sitio de integración.

Par de cebadores de amplificación	Secuencia de ADN
HXK2-FW / HXK2-RV	TTCGCCACTGTCTTATCTAC CCGTTCCGTTCCAGAATTATC
HXK1-FW / HXK1-RV	CCTTAGGACCGTTGAGAGGAATAG TCCCGGAGAACAAAGTAAGTGG
GLK1-FW/ GLK1-RV	AAAAACGGGAAATAACAATAACGAC TGCGATCTTATTAGTGTGTGACATT
Par de cebadores de diagnóstico	Secuencia de ADN
HXK2-FW2 / HXK2-RV2	GATTGCGAGATCCACGAAATTACC AATCACC GGATT CCTTACCAGTTG
HXK2-FW3 / HXK2-RV3	GAAATTCACGGGATTTATTCGTGAC TTCCATGTTTCTAAGCGTAGTGAG
HXK1-FW2 / HXK1-RV2	CCCGTTTGTTGGAAGATAGC CACATCAGCCATGGAACC
HXK1-FW3 / HXK1-RV3	GCAGGTGCTGCTGTTATTG CCGAGCTATCCTACGACTTTC
GLK1-FW4 / GLK1-RV4	GCCCGACAGGGTAACATATTATC CCGGAATCATAGGAAGACCTTTG

Par de cebadores de amplificación	Secuencia de ADN
GLK1-FW5 / GLK1-RV5	AGAGGAAGGTGCACTTGAAGATTG ATAAGATGGAATTGGCCGGTCTTG

Ejemplo 17

Reintroducción de la actividad de hexocinasa o glucocinasa en IMW058. La reintroducción bien de *HXK1*, bien de *HXK2* o bien de *GLK1* en la cepa IMW058 se realizó para restaurar el crecimiento sobre glucosa. Para esto, *HXK2*, *HXK1* y *GLK1* se amplificaron mediante PCR usando las combinaciones de oligonucleótidos HXK2FW / HXK2RV, HXK1FW / HXK1RV y GLK1 FW / GLK1RV, usando ADN genómico de *S. cerevisiae* CENPK113-7D como una plantilla. Después de la purificación de los productos de PCR (GenElute PCR Clean-up Kit, Sigma, Steinheim, Alemania), un cultivo durante la noche de IMW058 se transformó (Gietz y Woods 2002) con los productos de PCR. Se seleccionaron células transformadas con respecto al crecimiento sobre glucosa sobre MY-agar que contenía 2% de glucosa. La integración correcta de *HXK2*, *HXK1* y *GLK1* mediante recombinación homóloga en su locus original se verificó mediante PCR sobre colonias individuales usando oligonucleótidos de diagnóstico (Tabla 5).

Las cepas resultantes IMW059 (*HXK2*), IMW060 (*HXK1*) y IMW061 (*GLK1*) se cultivaron con una OD660 inicial de $0,05 \pm 0,01$ en matraces agitados a 30°C en medio de MY-urea (pH 4,7) complementado con 2% de glucosa y 2% de arabinosa, usando precultivos desarrollados sobre glucosa. El crecimiento y el consumo de azúcar se controló durante 72 horas. Las cepas IMW059, IMW060 y IMW061 eran todas capaces de utilizar tanto glucosa como arabinosa (Figura 17). La reintroducción de *HXK2* en IMW058 daba como resultado un consumo secuencial rápido de arabinosa y glucosa. Mientras que la cepa de referencia DS62504 no consumía completamente la arabinosa en 69 horas (Figura 17 (a)), la cepa IMW059 consumía más de 99% de la arabinosa en aproximadamente 46 horas (Figura 17 (j)).

Para las cepas IMW060 (*HXK1*) y IMW061 (*GLK1*), se observaba el consumo simultáneo de glucosa y arabinosa (Figuras 17 (k) y (l)). En las primeras 22 horas de cultivo, aproximadamente 18% de la arabinosa se consumía simultáneamente con aproximadamente 48% de la glucosa. En 50 horas de cultivo, se consumía 99% de la arabinosa.

Ejemplo 18

Secuenciación comparativa del genoma entero de las cepas IMK318, IMW017 y IMW018. La secuenciación del ADN del genoma entero para las cepas IMK318, IMW017 y IMW018 se realizó usando la tecnología Illumina GAllx (lecturas de 75 pb, extremos apareados). Las lecturas de secuencias se alinearon a una secuencia genómica de referencia de *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D usando CLC Genomics Workbench versión 4.5. El análisis de SNP se realizó usando CLC Genomics Workbench versión 4.5.

En total, el análisis de SNP daba cuatro mutaciones en las regiones codificantes que daban como resultado un cambio de aminoácido cuando IMK318, IMW017 y IMW018 se comparaban con la secuencia de referencia de CEN.PK 113-7D.

Una mutación, que daba como resultado un cambio de aminoácido Asp376Val en *GAL1* que codifica galactocinasa. La mutación se encontró en IMK318, IMW017 y IMW018 cuando se comparaba con la secuencia de referencia (Fig. 19).

Sorprendentemente, solo se encontraron dos mutaciones únicas para IMW017. Una de ellas, una mutación Tyr274Phe en *GAL1*, está situada en el sitio de unión a galactosa de galactocinasa, que fue descrita por Thoden y cols. (2005). Combinada con la observación de que la eliminación de *GAL1* en IMW017 elimina el crecimiento sobre glucosa, parece probable que esta mutación sea responsable de la actividad de hexocinasa de *GAL1* que permitía el consumo de glucosa en IMW017. Una segunda mutación se encontró en el motivo transmembranario 5 de *GAL2* (Thr219Asn), que codifica la galactosa permeasa en *S. cerevisiae*. Se sabe que *GAL2p* es capaz de transportar arabinosa (Kou y cols. 1970; Becker y cols. 2003). Una mutación en *GAL2* que incrementa la afinidad por arabinosa o disminuye la afinidad por glucosa dará como resultado una mejora del consumo de arabinosa en presencia de glucosa.

Sorprendentemente, solamente se encontró 1 única mutación en las regiones codificantes de IMW018. Esta mutación estaba situada en el motivo transmembranario 8 de *GAL2* (Asn376Ser), que codifica la galactosa permeasa en *S. cerevisiae*. Se sabe que *GAL2p* es capaz de transportar arabinosa (Kou y cols. 1970; Becker y cols. 2003). Una mutación en *GAL2* que incrementa la afinidad por arabinosa o disminuye la afinidad por glucosa dará como resultado una mejora en el consumo de arabinosa en presencia de glucosa.

Ejemplo 19

Fermentación anaerobia rápida de glucosa y arabinosa mediante IMW059

La cepa IMW059 se cultivó anaerobiamente en medio MY con 20 g l⁻¹ de glucosa y 20 g l⁻¹ de arabinosa. El consumo de azúcares se controló mediante medidas de HPLC. El crecimiento de la levadura se determinó mediante medidas del peso seco y controlando la OD660. La producción de CO₂ se determinó al medir las concentraciones de CO₂ en el gas de escape. La producción de etanol se calculó basándose en la producción de CO₂. Para corregir la evaporación de etanol, se supuso que la cantidad de etanol producida era igual a la producción acumulativa medida de CO₂ menos la producción de CO₂ que se producía debido a la síntesis de biomasa (5,85 mmol de CO₂ por gramo de biomasa) y el CO₂ asociado con la formación de acetato.

En 19 horas se agotaba la glucosa. Basándose en el perfil de producción de CO₂ y las concentraciones de arabinosa (Figura 21), el consumo de arabinosa se iniciaba después de que la glucosa se consumiera completamente. No se observó consumo simultáneo de glucosa y arabinosa. Después de 74 horas de cultivo anaerobio, se consumía 99% de la arabinosa. Se produjo etanol con un rendimiento global de 0,43 g g⁻¹ de azúcar total. La comparación del perfil de producción de CO₂ con el de la cepa DS62504 (Figura 24) muestra que, basándose en el primer pico de producción de CO₂ durante la fermentación anaerobia de una mezcla de glucosa/arabinosa, el consumo de glucosa es más lento para la cepa IMW059. Sin embargo, la arabinosa es consumida mucho más rápidamente por IMW059, lo que se refleja por los niveles de producción de CO₂ superiores durante el segundo pico de producción de CO₂ y el tiempo de fermentación total más breve.

Ejemplo 20

Consumo simultáneo anaerobio de glucosa y arabinosa por IMW060

La cepa IMW060 se cultivó anaerobiamente en medio MY con 20 g l⁻¹ de glucosa y 20 g l⁻¹ de arabinosa. El consumo de azúcares se controló mediante medidas de HPLC. El crecimiento de la levadura se determinó mediante medidas del peso seco y controlando la OD660. La producción de CO₂ se determinó al medir las concentraciones de CO₂ en el gas de escape. La producción de etanol se calculó basándose en la producción de CO₂. Para corregir la evaporación de etanol, se supuso que la cantidad de etanol producida era igual a la producción acumulativa medida de CO₂ menos la producción de CO₂ que se producía debido a la síntesis de biomasa (5,85 mmol de CO₂ por gramo de biomasa) y el CO₂ asociado con la formación de acetato.

Basándose en el perfil de producción de CO₂ y las concentraciones de glucosa y arabinosa (Figura 22), la arabinosa se consume simultáneamente con la glucosa aproximadamente en las primeras 40 horas. En las primeras 43 horas, la glucosa se consume completamente mientras que se consumía 41% de la arabinosa. Después de 74 horas de cultivo anaerobio, se consumía 89% de la arabinosa. Después de 140 horas de cultivo anaerobio, se consumía 98% de la arabinosa. Se produjo etanol con un rendimiento global de 0,43 g g⁻¹ de azúcar total. La comparación del perfil de producción de CO₂ con el de la cepa DS62504 (Figura 24) muestra que, basándose en el primer pico de producción de CO₂ durante la fermentación anaerobia de una mezcla de glucosa/arabinosa, el consumo de glucosa es más lento que para la cepa IMW060. Sin embargo, el tiempo total para fermentar la mezcla de glucosa/arabinosa es más corto que el de DS62504.

Ejemplo 21

Consumo simultáneo anaerobio de glucosa y arabinosa por IMW061

La cepa IMW061 se cultivó anaerobiamente en medio MY con 20 g l⁻¹ de glucosa y 20 g l⁻¹ de arabinosa. El consumo de azúcares se controló mediante medidas de HPLC. El crecimiento de la levadura se determinó mediante medidas del peso seco y controlando la OD660. La producción de CO₂ se determinó al medir las concentraciones de CO₂ en el gas de escape. La producción de etanol se calculó basándose en la producción de CO₂. Para corregir la evaporación de etanol, se supuso que la cantidad de etanol producida era igual a la producción acumulativa medida de CO₂ menos la producción de CO₂ que se producía debido a la síntesis de biomasa (5,85 mmol de CO₂ por gramo de biomasa) y el CO₂ asociado con la formación de acetato.

Basándose en el perfil de producción de CO₂ y las concentraciones de glucosa y arabinosa (Figura 23), la arabinosa se consume simultáneamente con la glucosa en las primeras 43 horas. En las primeras 49 horas, la glucosa se consume completamente mientras que se consumía 73% de la arabinosa. Después de 74 horas de cultivo anaerobio, se consumía 95% de la arabinosa. Después de 140 horas de cultivo anaerobio, se consumía 99% de la arabinosa. Se produjo etanol con un rendimiento global de 0,44 g g⁻¹ de azúcar total. La comparación del perfil de producción de CO₂ con el de la cepa DS62504 (Figura 24) muestra que, basándose en el primer pico de producción de CO₂ durante la fermentación anaerobia de una mezcla de glucosa/arabinosa, el consumo de glucosa es más

lento que para la cepa IMW061. Sin embargo, el tiempo total para fermentar la mezcla de glucosa/arabinosa es más corto que el de DS62504.

Ejemplo 22

Prueba de comportamiento en BAM

- 5 A fin de probar el comportamiento de las cepas IMW060 y IMW061, las cepas se inocularon en medio de Verduyn, complementado con 2% de glucosa. Como controles, se incluyó la cepa DS62504.

10 Después de la incubación durante la noche a 30°C y 280 rpm en un agitador giratorio, las células se recogieron mediante centrifugación y los cultivos para la producción de CO₂ se realizaron a 33°C en un BAM (Biological Activity Monitor), en 100 ml de medio de Verduyn complementado con los azúcares indicados en la tabla 7. Las células se añadieron a los 100 ml de medio de Verduyn complementado con los azúcares y los inhibidores ácido acético, ácido cumárico, ácido ferúlico, furfural, HMF y ácido fórmico a las concentraciones indicadas. En un segundo experimento, se usaron 100 ml de medio de Verduyn complementado con los azúcares pero sin inhibidores. La producción de CO₂ se controló constantemente y se tomaron muestras a intervalos para el análisis (densidad óptica a 600 nm, etanol y azúcares residuales).

15 Los resultados del experimento de BAM se muestran en las figuras 25, 26, y 27 para el medio con inhibidores y 28, 29 y 30 para el medio sin inhibidores. Se puede concluir que tanto IMW060 como IMW061 son capaces de convertir los azúcares glucosa y arabinosa rápidamente y simultáneamente en etanol, mientras que la cepa DS62504 no lo puede hacer, es decir DS62504 consume arabinosa después de que la glucosa se agote del medio. El mismo resultado, es decir consumo simultáneo de arabinosa y glucosa, se obtiene en presencia de inhibidores, aunque el tiempo empleado para consumir todos los azúcares es más lento en presencia de inhibidores, como se sabe de la bibliografía.

- 25 Tabla 7 Composición del medio de Verduyn CFMM2M; CFMM1M tiene la misma composición excepto que sin inhibidores:

Componente	Cantidad (g/l)
Glucosa	55
Arabinosa	35
Manosa	5
Ácido Acético	3,0
Ácido Cumárico *	0,03
Ácido Ferúlico*	0,2
Furfural**	0,1
HMF	0,1
Ácido fórmico	0,1

REFERENCIAS

- [1] A.A. Andreasen, T.J. Stier, Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium, *J. Cell Physiol.* 41 (1953) 23-36.
- 5 [2] A.A. Andreasen, T.J. Stier, Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium, *J. Cell Physiol.* 43 (1954) 271-281.
- [3] R.D. Gietz, R.A. Woods, Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method, *Methods Enzymol.* 350 (2002) 87-96.
- [4] U. Güldener, S. Heck, T. Fiedler, J. Beinhauer, J.H. Hegemann, A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 2519-2524.
- 10 [5] U. Güldener, J. Heinisch, G.J. Koehler, D. Voss, J.H. Hegemann, A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast, *Nucleic Acids Research* 30(6) (2002) e23.
- [6] H. Van Urk, P.R. Mak, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken, Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 y *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess, *Yeast* 4 (1988) 283-291.
- 15 [7] C. Verduyn, E. Postma, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken, Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration y alcoholic fermentation, *Yeast* 8 (1992) 501-517.
- [8] R.A. Weusthuis, W. Visser, J.T. Pronk, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken, Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts - a continuous-culture study of the Kluver effect, *Microbiology* 140 (1994) 703-715.
- [9] S.C. Kou, y cols. (1970). *J. Bact.* 102, 671-678.
- [10] J. Becker y cols. (2003). *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4144-4150.
- 20 [11] J.B. Thoden y cols. (2005). *J. Biol. Chem.* 280, 36905-36911

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> DSM IP Assets B.V.
- <120> CÉLULA DE LEVADURA FERMENTADORA DE PENTOSA Y GLUCOSA
- <130> 27925-WO-PCT
- 5 <160> 58
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- < 211> 62
- < 212> ADN
- 10 < 213> ADN artificial
- <220>
- < 223> ADN sintético
- <400> 1
- gttgtaggaa tataattctc cacacataat aagtacgcta attcagctga agcttcgtac 60
- gc 62
- 15 <210> 2
- < 211> 67
- < 212> ADN
- < 213> ADN artificial
- <220>
- 20 < 223> ADN sintético
- <400> 2
- aaaagggcac cttcttggtg ttcaaactta atttaccat taagtgcata ggccactagt 60
- ggatctg 67
- <210> 3
- < 211> 63
- 25 < 212> ADN
- < 213> ADN artificial
- <220>

ES 2 629 252 T3

< 223> ADN sintético

<400> 3

tttcttttaa tcaaactcac ccaaacaact caattagaat actgcagctg aagcttcgta 60

cgc 63

<210> 4

5 < 211> 69

< 212> ADN

< 213> ADN artificial

<220>

< 223> ADN sintético

10 <400> 4

gaataataat attaaggag ggaaaaacac atttatattt cattacagca taggccacta 60

gtggatctg 69

<210> 5

< 211> 64

< 212> ADN

15 < 213> ADN artificial

<220>

< 223> ADN sintético

<400> 5

ctcggacaaa ggtcttccta tgattccggc gttcgtcacc ggtccagct gaagcttcgt 60

acgc 64

20 <210> 6

< 211> 64

< 212> ADN

< 213> ADN artificial

<220>

25 < 223> ADN sintético

<400> 6

ES 2 629 252 T3

taaaggagag aagatggtaa gtacgggtggg atacgtacac aaacataggc cactagtgga 60
tctg 64

<210> 7
< 211> 20
< 212> ADN

5 < 213> ADN artificial
<220>
< 223> ADN sintético
<400> 7

cgcacgtcaa gactgtcaag 20

10 <210> 8
< 211> 20
< 212> ADN
< 213> ADN artificial
<220>

15 < 223> ADN sintético
<400> 8

tcgtatgtga atgctggtcg 20
<210> 9
< 211> 20

20 < 212> ADN
< 213> ADN artificial
<220>
< 223> ADN sintético
<400> 9

25 ttcgccactg tcttatctac 20
<210> 10
< 211> 20

- < 212> ADN
- < 213> ADN artificial
- <220>
- < 223> ADN sintético
- 5 <400> 10
- ccgttcggtc cagaattac 20
- <210> 11
- < 211> 24
- < 212> ADN
- 10 < 213> ADN artificial
- <220>
- < 223> ADN sintético
- <400> 11
- ccttaggacc gttgagagga atag 24
- 15 <210> 12
- < 211> 22
- < 212> ADN
- < 213> ADN artificial
- <220>
- 20 < 223> ADN sintético
- <400> 12
- tcccggagaa caaagtaagt gg 22
- <210> 13
- < 211> 25
- 25 < 212> ADN
- < 213> ADN artificial
- <220>
- < 223> ADN sintético

ES 2 629 252 T3

<400> 13

aaaaacggga aataacaata acgac 25

<210> 14

< 211> 25

5 < 212> ADN

< 213> ADN artificial

<220>

< 223> ADN sintético

<400> 14

10 tgcgatctta ttagtgtgtg acatt 25

<210> 15

< 211> 1458

< 212> ADN

< 213> *Saccharomyces cerevisiae* S288C

15 <400> 15

ES 2 629 252 T3

atggttcatt taggtccaaa gaaaccacag gctagaaagg gttccatggc tgatgtgccc 60
aaggaattga tggatgaaat tcatcagttg gaagatatgt ttacagttga cagcgagacc 120
ttgagaaagg ttgtaagca ctttatcgac gaattgaata aaggtttgac aaagaaggga 180
ggtaacattc caatgattcc cggttgggtc atggaattcc caacaggtaa agaactctgt 240
aactatttgg ccattgattt gggtggtact aacttaagag tctgtttggt caagttgagc 300
ggtaaccata cctttgacac cactcaatcc aagtataaac taccacatga catgagaacc 360
actaagcacc aagaggagtt atggctcctt attgccgact ctttgaagga ctttatggtc 420
gagcaagaat tgctaaacac caaggacacc ttaccattag gtttcacctt ctcgtaccca 480
gcttcccaaa acaagattaa cgaaggtatt ttgcaaagat ggaccaaggg tttcgaatatt 540
ccaatgtcg aagccacga tgcctgcca ttgctacaaa acgaaatttc caagagagag 600
ttgcctattg aaattgtagc attgattaat gatactgttg gtactttaat tgcctcatac 660
tactactgacc cagagactaa gatgggtgtg attttcggta ctggtgtcaa cgggtgcttc 720
tatgatgttg tttccgatat cgaaggttg gagggcaaat tagcagacga tattccaagt 780
aactctccaa tggctatcaa ttgtgaatat ggctccttcg ataatagaaca tttggtcttg 840
ccaagaacca agtacgatgt tgctgtcgac gaacaatctc caagacctgg tcaacaagct 900
tttgaagaaga tgacctccgg ttactacttg ggtgaattgt tgcgtctagt gttacttgaa 960
ttaaacgaga agggttgat gttgaaggat caagatctaa gcaagttgaa acaaccatac 1020
atcatggata cctcctaccc agcaagaatc gaggatgatc catttgaaaa cttggaagat 1080
actgatgaca tcttccaaaa ggactttggt gtcaagacca ctctgccaga acgtaagttg 1140
attagaagac tttgtgaatt gatcgggtacc agagctgcta gattagctgt ttgtggtatt 1200
gccgctatth gccaaaagag aggttacaag actggtcaca ttgccgctga cggttctgtc 1260
tataacaaat acccaggttt caaggaagcc gccgctaagg gtttgagaga tatctatgga 1320
tggactggtg acgcaagcaa agatccaatt acgattgttc cagctgagga tggttcaggt 1380
gcaggtgctg ctgttattgc tgcattgtcc gaaaaaagaa ttgccgaagg taagtctctt 1440
ggtatcattg gcgcttaa 1458

<210> 16

< 211> 1461

< 212> ADN

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae S288C

<400> 16

ES 2 629 252 T3

atggttcatt taggtccaaa aaaaccacaa gccagaaagg gttccatggc cgatgtgcca 60
aaggaattga tgcaacaaat tgagaatfff gaaaaaattt tcaactgttcc aactgaaact 120
ttacaagccg ttaccaagca cttcatttcc gaattggaaa agggtttgtc caagaagggt 180
ggtaacattc caatgattcc aggttggggt atggatttcc caactggtaa ggaatccggt 240
gatttcttgg ccattgattt ggggtgtacc aacttgagag ttgtcttagt caagttgggc 300
ggtgaccgta cctttgacac cactcaatct aagtacagat taccagatgc tatgagaact 360
actcaaaatc cagacgaatt gtgggaatff attgccgact ctttgaaagc ttttattgat 420
gagcaattcc cacaaggtat ctctgagcca attccattgg gtttcacctt ttctttccca 480
gcttctcaaa acaaaatcaa tgaaggtatc ttgcaaagat ggactaaagg ttttgatatt 540
ccaacattg aaaaccacga tgttgttcca atgttgcaaa agcaaatcac taagaggaat 600
atcccaattg aagttgttgc tttgataaac gacactaccg gtacttttgt tgcttcttac 660
tactactgacc cagaaactaa gatgggtgtt atcttcggta ctggtgtcaa tgggtgcttac 720
tacgatgttt gttccgatat cgaagagcta caagaaaac tatctgatga cattccacca 780
tctgctccaa tggccatcaa ctgtgaatac ggttccttcg ataatagaaca tgcgttttg 840
ccaagaacta aatacgatat caccattgat gaagaatctc caagaccagg ccaacaaacc 900
tttgaaaaaa tgtcttctgg ttactactta ggtgaaatff tgcgtttggc cttgatggac 960
atgtacaaac aaggtttcat cttcaagaac caagacttgt ctaagttcga caagcctttc 1020
gtcatggaca cttcttacc agccagaatc gaggaagatc cattcgagaa cctagaagat 1080
accgatgact tgttccaaaa tgagttcgggt atcaacacta ctgttcaaga acgtaaattg 1140
atcagacggt tatctgaatt gattggtgct agagctgcta gattgtccgt ttgtggtatt 1200
gctgctatct gtcaaaagag aggttacaag accggtcaca tcgctgcaga cggttccggt 1260
tacaacagat acccaggttt caaagaaaag gctgccaatg ctttgaagga catttacggc 1320
tgactcaaa cctcaactaga cgactacca atcaagattg ttctgctga agatggttcc 1380
ggtgctggtg ccgctgttat tgctgctttg gcccaaaaaa gaattgctga aggtaagtcc 1440
gttggtatca tcggtgctta a 1461

<210> 17

< 211> 1503

< 212> ADN

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae S288C

<400> 17

atgtcattcg acgacttaca caaagccact gagagagcgg tcatccaggc cgtggaccag 60
atctgcgacg atttogaggt taccgccgag aagctggacg aattaactgc ttacttcac 120

ES 2 629 252 T3

gaacaaatgg aaaaaggctct agctccacca aaggaaggcc acacattggc ctcgacaaa 180
 ggtcttccta tgattccggc gttcgtcacc gggtcaccca acgggacgga gcgcggtggt 240
 ttactagccg ccgacctggg tggtagcaat ttccgtatat gttctgttaa cttgcatgga 300
 gatcatactt tctccatgga gcaaatgaag tccaagattc ccgatgattt gctagacgat 360
 gagaacgtca catctgacga cctgtttggg tttctagcac gtcgtacact ggcctttatg 420
 aagaagtatc acccggacga gttggccaag ggtaaagacg ccaagcccat gaaactgggg 480
 ttcactttct cataccctgt agaccagacc tctctaaact ccgggacatt gatccgttgg 540
 accaagggtt tccgcatcgc ggacaccgtc ggaaaggatg tcgtgcaatt gtaccaggag 600
 caattaagcg ctcagggtat gcctatgatc aaggttgttg cattaaccaa cgacaccgtc 660
 ggaacgtacc tatcgcattg ctacacgtcc gataacacgg actcaatgac gtccggagaa 720
 atctcggagc cggtcacggt atgtattttc ggtaccggta ccaatgggtg ctatatggag 780
 gagatcaaca agatcacgaa gttgccacag gagttgcgtg acaagttgat aaaggagggt 840
 aagacacaca tgatcatcaa tgtcgaatgg gggctcttcg ataatgagct caagcacttg 900
 cctactacta agtatgacgt cgtaattgac cagaaactgt caacgaaccg gggatttcac 960
 ttgtttgaaa aacgtgtctc agggatgttc ttgggtgagg tgttgcgtaa cattttagtg 1020
 gacttgactc cgcaaggctt gcttttgcaa cagtacaggt ccaaggaaca acttcctcgc 1080
 cacttgacta cacctttcca gttgtcatcc gaagtgtgtg cgcatattga aattgacgac 1140
 tcgacaggtc tacgtgaaac agagttgtca ttattacaga gtctcagact gccaccact 1200
 ccaacagagc gtgttcaaat tcaaaaattg gtgcgcgca tttctaggag atctgcgtat 1260
 ttagccgccg tgccgcttgc cgcgatattg atcaagaaa atgctttgaa caagagatat 1320
 catggtgaag tcgagatcgg ttgtgatggt tccgttgtgg aatactaccg cggtttcaga 1380
 tctatgctga gacacgcctt agccttgtca cccttgggtg ccgaggggtg gaggaagggtg 1440
 cacttgaaga ttgccaagga tggttccgga gtgggtgccg ccttgtgtgc gctttagca 1500
 tga 1503

<210> 18

< 211> 1587

< 212> ADN

5 < 213> *Saccharomyces cerevisiae* S288C

<400> 18

atgactaaat ctcatcaga agaagtgatt gtacctgagt tcaattctag cgcaaaggaa 60
 ttaccaagac cattggccga aaagtgcccg agcataatta agaaatttat aagcgcttat 120
 gatgctaaac cggattttgt tgctagatcg cctggttagag tcaatctaata tggatgaacat 180
 attgattatt gtgacttctc ggttttacct ttagctattg attttgatat gctttgcgcc 240

ES 2 629 252 T3

gtcaaagttt tgaacgagaa aaatccatcc attaccttaa taaatgctga tcccaaattt 300
gctcaaagga agttcgattt gccgttggac ggttcttatg tcacaattga tccttctgtg 360
tcggactggt ctaattactt taaatgtggt ctccatggtg ctccactctt tctaaagaaa 420
cttgaccogg aaaggtttgc cagtgtcctc ctggccgggc tgcaagtctt ctgtgagggt 480
gatgtaccaa ctggcagtgg attgtcttct tcggccgcat tcatttgtgc cgttgcttta 540
gctgttgta aagcgaatat gggccctggt tatcatatgt ccaagcaaaa tttaatgcgt 600
attacggtcg ttgcagaaca ttatgttggg gttacaatg gcggtatgga tcaggctgcc 660
tctgtttgcg gtgaggaaga tcatgctcta tacgttgagt tcaaaccgca gttgaaggct 720
actccgttta aatttccgca attaaaaaac catgaaatta gctttgttat tgccaacacc 780
cttgttgat ctaacaagtt tgaaaccgcc ccaaccaact ataatttaag agtggtagaa 840
gtcactacag ctgcaaatgt tttagctgcc acgtacggtg ttgttttact ttctgaaaa 900
gaaggatcga gcacgaataa aggtaatcta agagatttca tgaacgttta ttatgccaga 960
tatcacaaca tttccacacc ctggaacggc gatattgaat ccggcatcga acggttaaca 1020
aagatgctag tactagttga agagtctctc gccataaga aacagggctt tagtgttgac 1080
gatgtcgcac aatccttgaa ttgttctcgc gaagaattca caagagacta cttacaaca 1140
tctccagtga gatttcaagt cttaaagcta tatcagaggg ctaagcatgt gtattctgaa 1200
tctttaagag tcttgaaggc tgtgaaatta atgactacag cgagctttac tgccgacgaa 1260
gactttttca agcaatttgg tgccttgatg aacgagtctc aagcttcttg cgataaactt 1320
tacgaatgtt cttgtccaga gattgacaaa atttgttcca ttgctttgtc aaatggatca 1380
tatggttccc gtttgaccgg agctggctgg ggtggttga ctgttcactt ggttccaggg 1440
ggcccaaatg gcaacataga aaaggtaaaa gaagcccttg ccaatgagtt ctacaaggtc 1500
aagtacccta agatcactga tgctgagcta gaaaatgcta tcatcgtctc taaaccagca 1560
ttgggcagct gtctatatga attataa 1587

<210> 19

< 211> 1503

< 212> ADN

5 < 213> *Saccharomyces cerevisiae* S288C

<400> 19

atgtcatttg aaaatttaca taaagtcaat gctgaggcat tggaaagatgc agtggttgg 60
atctgctcct cattgcaggt tgatgcagca aagttggacg aactaacagc gtacttcatt 120
gaatgtatgg aaaagggggt gaataacacc tctgtaggcg aagaaaagac ggtggacaag 180
ggctaccaca tgatccctac atatgtaacc agtttgccca atgggacgga acgtggtgtt 240
ttgctggctg cagatttagg tgggactcac ttcagagtgt gttctgtgac tttgaatggt 300

ES 2 629 252 T3

gacggaacct ttgatatgca gcaattgaag tctaagattc cggaagaata tctaaatgac 360
aaggatgtca ccagcgagga gctgttttagc tacctgggtc gccgtacaag ggccttcggt 420
aggaagcatc atcctgagtt gttgaagtcc acgggggaga acataaaacc tttgaaaatg 480
ggatttacct tctcatatcc cgttgaccaa acctctttga gttccggtagc tttaatcaga 540
tggaccaaaa gcttcaagat tgaagacacg gtcggcaagg atgtcgtgag gttataccag 600
gagcaattag acattcaggg gctctctatg attaatgtgg tagctttgac caacgacacg 660
gttggcactt tcctatccca ctgctacact tcaggctctc gtccatcgag tgctggtgag 720
attagcgagc ctgtcattgg ttgtatcttt ggtactggta ctaacggttg ctatatggag 780
gatattgaaa acatcaagaa gctaccagat gagctcagaa caagactgct gcatgaagga 840
aaaaccctaaa tgtgcatcaa catcgaatgg ggttctttcg acaatgaatt gaaacatttg 900
tctgctacaa agtatgacat cgatattgac caaaaatctt ctccaaatcc aggttaccat 960
ctatttgaaa aaagaatttc cggcatgtac ttgggtgagc tgtaaggaa catcctggtg 1020
gacttgcattg caaggggctt aatcttggga cagtatcgta attacgatca attacctcac 1080
cgtttaaaga ctcttttcca attgtgcagt gaagttcttt ccaggattga aatcgatgat 1140
tcgacaaact tgcgtgaaac tgaattgtcg tttttgcaga gtttgaggct accgaccact 1200
tttgaagaac gtaaagcaat tcaaaatctg gtccgttcca ttaogagaag gtctgcatat 1260
ctagcagccg ttccgattgc cgccatccta atcaagacaa acgctttgaa caaaagatat 1320
cacggtgagg tagaaattgg ttttgacggt tatgtcatcg aatactatcc tggattcaga 1380
tccatgctga gacatgcttt ggcattaagt ccaattggca ctgaggggtga acgtaagata 1440
catttgctgc tagccaaaga tgggtccggt gttggcgcag ctttgtgtgc tctggtggca 1500
taa 1503

<210> 20

< 211> 1302

< 212> ADN

5 < 213> *Saccharomyces cerevisiae* S288C

<400> 20

atgacaattg aaagcactct agctcgggaa ttagaaagct tgattttacc cgctgattcc 60
atagtgaatg tagttgacca attccaagag gagttgttat cacggcttca gacaaatagc 120
atctctatgc tcccgcagtg tttagtccca gataaacgat cgcgatggaa ccctgaagac 180
aaaattctga ccattgattt cggcgggaca agactgaaat ttgcaattat ctctctgccc 240
caaatcgtta tcgaatacaa tgatgccttc gaacttacct acaacatcgt tgattcgaat 300
ttctttaatc aaatcatcta tacaatatgt accaggctgg ctgcaaatgg ttatataaaa 360
aaaaagaacg agtcatctga ggcgtctaaa ttttttgttt ccgtgacatt cagttttcct 420

ES 2 629 252 T3

ctaaatccag aaggggaggt agttgcaatg ggaaaaggat ttgtgatgac tgacaccctt 480
caaggatcca cggtgaaaca gctcatccaa tcttcctttc accggattat atcagaaaaat 540
atcgaagaat ttttctgtac catgaacgtg tgatcatgtaa taaacgatgc aattgcagtt 600
tcactaaca gcaaatttat atgcgaaaac gattccatct cattaataat aggaactggt 660
acaaatgcat gttttgaggt tccatacggg tatttaccac ctttcaagag agatgccctg 720
agagaaacat taccgtcaag ctataataag gagacattaa atttcaaaca tgttctcatt 780
aattctgaaa ttggctttat tggtaaaaat gtcattgcat tgcaaccggt tgacattcat 840
ggagcaatct catacgaat gccactagag tgcgttactt ctggtaaatg gcttccccta 900
tcattaaaaa atattctatt gcaatataac ataatcccca aaaacttccc agtagagttc 960
aatggggaac tggtatgcca gctggcagaa gactgtacta atgcttggtt cgaaaacgaa 1020
cattatgcac taatttgtca gatcgacgca ctattaatca agagagccgc attttatggt 1080
gctgcaattg tacaagctat tgatatcatc acaggctgca aaaactataa ctttattcat 1140
attggctacg ttggatcctt totccacaat tcaaattttt atcgagagca gataaaatat 1200
tactccagca tacatattaa gttgcaattc ttaaatcaca gtaatcttct aggcgctgca 1260
atagccacct acttgaacaa atcagacaac caagttcaat aa 1302

<210> 21

< 211> 485

< 212> PRT

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae S288C

<400> 21

Met Val His Leu Gly Pro Lys Lys Pro Gln Ala Arg Lys Gly Ser Met
1 5 10 15

Ala Asp Val Pro Lys Glu Leu Met Asp Glu Ile His Gln Leu Glu Asp
20 25 30

Met Phe Thr Val Asp Ser Glu Thr Leu Arg Lys Val Val Lys His Phe
35 40 45

Ile Asp Glu Leu Asn Lys Gly Leu Thr Lys Lys Gly Gly Asn Ile Pro
50 55 60

Met Ile Pro Gly Trp Val Met Glu Phe Pro Thr Gly Lys Glu Ser Gly
65 70 75 80

Asn Tyr Leu Ala Ile Asp Leu Gly Gly Thr Asn Leu Arg Val Val Leu
85 90 95

ES 2 629 252 T3

Val Lys Leu Ser Gly Asn His Thr Phe Asp Thr Thr Gln Ser Lys Tyr
100 105 110

Lys Leu Pro His Asp Met Arg Thr Thr Lys His Gln Glu Glu Leu Trp
115 120 125

Ser Phe Ile Ala Asp Ser Leu Lys Asp Phe Met Val Glu Gln Glu Leu
130 135 140

Leu Asn Thr Lys Asp Thr Leu Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Pro
145 150 155 160

Ala Ser Gln Asn Lys Ile Asn Glu Gly Ile Leu Gln Arg Trp Thr Lys
165 170 175

Gly Phe Asp Ile Pro Asn Val Glu Gly His Asp Val Val Pro Leu Leu
180 185 190

Gln Asn Glu Ile Ser Lys Arg Glu Leu Pro Ile Glu Ile Val Ala Leu
195 200 205

Ile Asn Asp Thr Val Gly Thr Leu Ile Ala Ser Tyr Tyr Thr Asp Pro
210 215 220

Glu Thr Lys Met Gly Val Ile Phe Gly Thr Gly Val Asn Gly Ala Phe
225 230 235 240

Tyr Asp Val Val Ser Asp Ile Glu Lys Leu Glu Gly Lys Leu Ala Asp
245 250 255

Asp Ile Pro Ser Asn Ser Pro Met Ala Ile Asn Cys Glu Tyr Gly Ser
260 265 270

Phe Asp Asn Glu His Leu Val Leu Pro Arg Thr Lys Tyr Asp Val Ala
275 280 285

Val Asp Glu Gln Ser Pro Arg Pro Gly Gln Gln Ala Phe Glu Lys Met
290 295 300

Thr Ser Gly Tyr Tyr Leu Gly Glu Leu Leu Arg Leu Val Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asn Glu Lys Gly Leu Met Leu Lys Asp Gln Asp Leu Ser Lys Leu
325 330 335

Lys Gln Pro Tyr Ile Met Asp Thr Ser Tyr Pro Ala Arg Ile Glu Asp
340 345 350

ES 2 629 252 T3

Asp Pro Phe Glu Asn Leu Glu Asp Thr Asp Asp Ile Phe Gln Lys Asp
 355 360 365

Phe Gly Val Lys Thr Thr Leu Pro Glu Arg Lys Leu Ile Arg Arg Leu
 370 375 380

Cys Glu Leu Ile Gly Thr Arg Ala Ala Arg Leu Ala Val Cys Gly Ile
 385 390 395 400

Ala Ala Ile Cys Gln Lys Arg Gly Tyr Lys Thr Gly His Ile Ala Ala
 405 410 415

Asp Gly Ser Val Tyr Asn Lys Tyr Pro Gly Phe Lys Glu Ala Ala Ala
 420 425 430

Lys Gly Leu Arg Asp Ile Tyr Gly Trp Thr Gly Asp Ala Ser Lys Asp
 435 440 445

Pro Ile Thr Ile Val Pro Ala Glu Asp Gly Ser Gly Ala Gly Ala Ala
 450 455 460

Val Ile Ala Ala Leu Ser Glu Lys Arg Ile Ala Glu Gly Lys Ser Leu
 465 470 475 480

Gly Ile Ile Gly Ala
 485

<210> 22

< 211> 486

< 212> PRT

5 < 213> *Saccharomyces cerevisiae* S288C

<400> 22

Met Val His Leu Gly Pro Lys Lys Pro Gln Ala Arg Lys Gly Ser Met
 1 5 10 15

Ala Asp Val Pro Lys Glu Leu Met Gln Gln Ile Glu Asn Phe Glu Lys
 20 25 30

Ile Phe Thr Val Pro Thr Glu Thr Leu Gln Ala Val Thr Lys His Phe
 35 40 45

Ile Ser Glu Leu Glu Lys Gly Leu Ser Lys Lys Gly Gly Asn Ile Pro
 50 55 60

Met Ile Pro Gly Trp Val Met Asp Phe Pro Thr Gly Lys Glu Ser Gly
 65 70 75 80

ES 2 629 252 T3

Asp Phe Leu Ala Ile Asp Leu Gly Gly Thr Asn Leu Arg Val Val Leu
 85 90 95
 Val Lys Leu Gly Gly Asp Arg Thr Phe Asp Thr Thr Gln Ser Lys Tyr
 100 105 110
 Arg Leu Pro Asp Ala Met Arg Thr Thr Gln Asn Pro Asp Glu Leu Trp
 115 120 125
 Glu Phe Ile Ala Asp Ser Leu Lys Ala Phe Ile Asp Glu Gln Phe Pro
 130 135 140
 Gln Gly Ile Ser Glu Pro Ile Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro
 145 150 155 160
 Ala Ser Gln Asn Lys Ile Asn Glu Gly Ile Leu Gln Arg Trp Thr Lys
 165 170 175
 Gly Phe Asp Ile Pro Asn Ile Glu Asn His Asp Val Val Pro Met Leu
 180 185 190
 Gln Lys Gln Ile Thr Lys Arg Asn Ile Pro Ile Glu Val Val Ala Leu
 195 200 205
 Ile Asn Asp Thr Thr Gly Thr Leu Val Ala Ser Tyr Tyr Thr Asp Pro
 210 215 220
 Glu Thr Lys Met Gly Val Ile Phe Gly Thr Gly Val Asn Gly Ala Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Asp Val Cys Ser Asp Ile Glu Lys Leu Gln Gly Lys Leu Ser Asp
 245 250 255
 Asp Ile Pro Pro Ser Ala Pro Met Ala Ile Asn Cys Glu Tyr Gly Ser
 260 265 270
 Phe Asp Asn Glu His Val Val Leu Pro Arg Thr Lys Tyr Asp Ile Thr
 275 280 285
 Ile Asp Glu Glu Ser Pro Arg Pro Gly Gln Gln Thr Phe Glu Lys Met
 290 295 300
 Ser Ser Gly Tyr Tyr Leu Gly Glu Ile Leu Arg Leu Ala Leu Met Asp
 305 310 315 320
 Met Tyr Lys Gln Gly Phe Ile Phe Lys Asn Gln Asp Leu Ser Lys Phe
 325 330 335

ES 2 629 252 T3

Asp Lys Pro Phe Val Met Asp Thr Ser Tyr Pro Ala Arg Ile Glu Glu
 340 345 350

Asp Pro Phe Glu Asn Leu Glu Asp Thr Asp Asp Leu Phe Gln Asn Glu
 355 360 365

Phe Gly Ile Asn Thr Thr Val Gln Glu Arg Lys Leu Ile Arg Arg Leu
 370 375 380

Ser Glu Leu Ile Gly Ala Arg Ala Ala Arg Leu Ser Val Cys Gly Ile
 385 390 395 400

Ala Ala Ile Cys Gln Lys Arg Gly Tyr Lys Thr Gly His Ile Ala Ala
 405 410 415

Asp Gly Ser Val Tyr Asn Arg Tyr Pro Gly Phe Lys Glu Lys Ala Ala
 420 425 430

Asn Ala Leu Lys Asp Ile Tyr Gly Trp Thr Gln Thr Ser Leu Asp Asp
 435 440 445

Tyr Pro Ile Lys Ile Val Pro Ala Glu Asp Gly Ser Gly Ala Gly Ala
 450 455 460

Ala Val Ile Ala Ala Leu Ala Gln Lys Arg Ile Ala Glu Gly Lys Ser
 465 470 475 480

Val Gly Ile Ile Gly Ala
 485

<210> 23

< 211> 500

< 212> PRT

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae S288C

<400> 23

Met Ser Phe Asp Asp Leu His Lys Ala Thr Glu Arg Ala Val Ile Gln
 1 5 10 15

Ala Val Asp Gln Ile Cys Asp Asp Phe Glu Val Thr Pro Glu Lys Leu
 20 25 30

Asp Glu Leu Thr Ala Tyr Phe Ile Glu Gln Met Glu Lys Gly Leu Ala
 35 40 45

Pro Pro Lys Glu Gly His Thr Leu Ala Ser Asp Lys Gly Leu Pro Met
 50 55 60

ES 2 629 252 T3

Ile Pro Ala Phe Val Thr Gly Ser Pro Asn Gly Thr Glu Arg Gly Val
65 70 75 80

Leu Leu Ala Ala Asp Leu Gly Gly Thr Asn Phe Arg Ile Cys Ser Val
85 90 95

Asn Leu His Gly Asp His Thr Phe Ser Met Glu Gln Met Lys Ser Lys
100 105 110

Ile Pro Asp Asp Leu Leu Asp Asp Glu Asn Val Thr Ser Asp Asp Leu
115 120 125

Phe Gly Phe Leu Ala Arg Arg Thr Leu Ala Phe Met Lys Lys Tyr His
130 135 140

Pro Asp Glu Leu Ala Lys Gly Lys Asp Ala Lys Pro Met Lys Leu Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Tyr Pro Val Asp Gln Thr Ser Leu Asn Ser Gly Thr
165 170 175

Leu Ile Arg Trp Thr Lys Gly Phe Arg Ile Ala Asp Thr Val Gly Lys
180 185 190

Asp Val Val Gln Leu Tyr Gln Glu Gln Leu Ser Ala Gln Gly Met Pro
195 200 205

Met Ile Lys Val Val Ala Leu Thr Asn Asp Thr Val Gly Thr Tyr Leu
210 215 220

Ser His Cys Tyr Thr Ser Asp Asn Thr Asp Ser Met Thr Ser Gly Glu
225 230 235 240

Ile Ser Glu Pro Val Ile Gly Cys Ile Phe Gly Thr Gly Thr Asn Gly
245 250 255

Cys Tyr Met Glu Glu Ile Asn Lys Ile Thr Lys Leu Pro Gln Glu Leu
260 265 270

Arg Asp Lys Leu Ile Lys Glu Gly Lys Thr His Met Ile Ile Asn Val
275 280 285

Glu Trp Gly Ser Phe Asp Asn Glu Leu Lys His Leu Pro Thr Thr Lys
290 295 300

Tyr Asp Val Val Ile Asp Gln Lys Leu Ser Thr Asn Pro Gly Phe His

ES 2 629 252 T3

Asn Tyr Asn Leu Arg Val Val Glu Val Thr Thr Ala Ala Asn Val Leu
 275 280 285

Ala Ala Thr Tyr Gly Val Val Leu Leu Ser Gly Lys Glu Gly Ser Ser
 290 295 300

Thr Asn Lys Gly Asn Leu Arg Asp Phe Met Asn Val Tyr Tyr Ala Arg
 305 310 315 320

Tyr His Asn Ile Ser Thr Pro Trp Asn Gly Asp Ile Glu Ser Gly Ile
 325 330 335

Glu Arg Leu Thr Lys Met Leu Val Leu Val Glu Glu Ser Leu Ala Asn
 340 345 350

Lys Lys Gln Gly Phe Ser Val Asp Asp Val Ala Gln Ser Leu Asn Cys
 355 360 365

Ser Arg Glu Glu Phe Thr Arg Asp Tyr Leu Thr Thr Ser Pro Val Arg
 370 375 380

Phe Gln Val Leu Lys Leu Tyr Gln Arg Ala Lys His Val Tyr Ser Glu
 385 390 395 400

Ser Leu Arg Val Leu Lys Ala Val Lys Leu Met Thr Thr Ala Ser Phe
 405 410 415

Thr Ala Asp Glu Asp Phe Phe Lys Gln Phe Gly Ala Leu Met Asn Glu
 420 425 430

Ser Gln Ala Ser Cys Asp Lys Leu Tyr Glu Cys Ser Cys Pro Glu Ile
 435 440 445

Asp Lys Ile Cys Ser Ile Ala Leu Ser Asn Gly Ser Tyr Gly Ser Arg
 450 455 460

Leu Thr Gly Ala Gly Trp Gly Gly Cys Thr Val His Leu Val Pro Gly
 465 470 475 480

Gly Pro Asn Gly Asn Ile Glu Lys Val Lys Glu Ala Leu Ala Asn Glu
 485 490 495

Phe Tyr Lys Val Lys Tyr Pro Lys Ile Thr Asp Ala Glu Leu Glu Asn
 500 505 510

Ala Ile Ile Val Ser Lys Pro Ala Leu Gly Ser Cys Leu Tyr Glu Leu
 515 520 525

<210> 25

< 211> 500

< 212> PRT

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae S288C

ES 2 629 252 T3

<400> 25

Met Ser Phe Glu Asn Leu His Lys Val Asn Ala Glu Ala Leu Glu Asp
 1 5 10 15

Ala Val Val Glu Ile Cys Ser Ser Leu Gln Val Asp Ala Ala Lys Leu
 20 25 30

Asp Glu Leu Thr Ala Tyr Phe Ile Glu Cys Met Glu Lys Gly Leu Asn
 35 40 45

Asn Thr Ser Val Gly Glu Glu Lys Thr Val Asp Lys Gly Leu Pro Met
 50 55 60

Ile Pro Thr Tyr Val Thr Ser Leu Pro Asn Gly Thr Glu Arg Gly Val
 65 70 75 80

Leu Leu Ala Ala Asp Leu Gly Gly Thr His Phe Arg Val Cys Ser Val
 85 90 95

Thr Leu Asn Gly Asp Gly Thr Phe Asp Met Gln Gln Leu Lys Ser Lys
 100 105 110

Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Asn Asp Lys Asp Val Thr Ser Glu Glu Leu
 115 120 125

Phe Ser Tyr Leu Gly Arg Arg Thr Arg Ala Phe Val Arg Lys His His
 130 135 140

Pro Glu Leu Leu Lys Ser Thr Gly Glu Asn Ile Lys Pro Leu Lys Met
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Pro Val Asp Gln Thr Ser Leu Ser Ser Gly
 165 170 175

Thr Leu Ile Arg Trp Thr Lys Ser Phe Lys Ile Glu Asp Thr Val Gly
 180 185 190

Lys Asp Val Val Arg Leu Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Ile Gln Gly Leu
 195 200 205

Ser Met Ile Asn Val Val Ala Leu Thr Asn Asp Thr Val Gly Thr Phe
 210 215 220

ES 2 629 252 T3

Leu Ser His Cys Tyr Thr Ser Gly Ser Arg Pro Ser Ser Ala Gly Glu
 225 230 235 240
 Ile Ser Glu Pro Val Ile Gly Cys Ile Phe Gly Thr Gly Thr Asn Gly
 245 250 255
 Cys Tyr Met Glu Asp Ile Glu Asn Ile Lys Lys Leu Pro Asp Glu Leu
 260 265 270
 Arg Thr Arg Leu Leu His Glu Gly Lys Thr Gln Met Cys Ile Asn Ile
 275 280 285
 Glu Trp Gly Ser Phe Asp Asn Glu Leu Lys His Leu Ser Ala Thr Lys
 290 295 300
 Tyr Asp Ile Asp Ile Asp Gln Lys Phe Ser Pro Asn Pro Gly Tyr His
 305 310 315 320
 Leu Phe Glu Lys Arg Ile Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu Leu Leu Arg
 325 330 335
 Asn Ile Leu Val Asp Leu His Ala Arg Gly Leu Ile Leu Gly Gln Tyr
 340 345 350
 Arg Asn Tyr Asp Gln Leu Pro His Arg Leu Lys Thr Pro Phe Gln Leu
 355 360 365
 Cys Ser Glu Val Leu Ser Arg Ile Glu Ile Asp Asp Ser Thr Asn Leu
 370 375 380
 Arg Glu Thr Glu Leu Ser Phe Leu Gln Ser Leu Arg Leu Pro Thr Thr
 385 390 395 400
 Phe Glu Glu Arg Lys Ala Ile Gln Asn Leu Val Arg Ser Ile Thr Arg
 405 410 415
 Arg Ser Ala Tyr Leu Ala Ala Val Pro Ile Ala Ala Ile Leu Ile Lys
 420 425 430
 Thr Asn Ala Leu Asn Lys Arg Tyr His Gly Glu Val Glu Ile Gly Phe
 435 440 445
 Asp Gly Tyr Val Ile Glu Tyr Tyr Pro Gly Phe Arg Ser Met Leu Arg
 450 455 460
 His Ala Leu Ala Leu Ser Pro Ile Gly Thr Glu Gly Glu Arg Lys Ile
 465 470 475 480
 His Leu Arg Leu Ala Lys Asp Gly Ser Gly Val Gly Ala Ala Leu Cys
 485 490 495
 Ala Leu Val Ala
 500

ES 2 629 252 T3

<210> 26

< 211> 433

< 212> PRT

< 213> Saccharomyces cerevisiae S288C

5 <400> 26

Met Thr Ile Glu Ser Thr Leu Ala Arg Glu Leu Glu Ser Leu Ile Leu
1 5 10 15

Pro Ala Asp Ser Ile Val Asn Val Val Asp Gln Phe Gln Glu Glu Leu
20 25 30

Leu Ser Arg Leu Gln Thr Asn Thr Ile Ser Met Leu Pro Gln Cys Leu
35 40 45

Val Pro Asp Lys Arg Ser Arg Trp Asn Pro Glu Asp Lys Ile Leu Thr
50 55 60

Ile Asp Phe Gly Gly Thr Arg Leu Lys Phe Ala Ile Ile Ser Leu Pro
65 70 75 80

Gln Ile Val Ile Glu Tyr Asn Asp Ala Phe Glu Leu Thr Tyr Asn Ile
85 90 95

Val Asp Ser Asn Phe Phe Asn Gln Ile Ile Tyr Thr Ile Cys Thr Arg
100 105 110

Leu Ala Ala Asn Gly Tyr Ile Lys Lys Lys Asn Glu Ser Ser Glu Ala
115 120 125

Ser Lys Phe Phe Val Ser Val Thr Phe Ser Phe Pro Leu Asn Pro Glu
130 135 140

Gly Glu Val Val Ala Met Gly Lys Gly Phe Val Met Thr Asp Thr Leu
145 150 155 160

Gln Gly Ser Thr Val Lys Gln Leu Ile Gln Ser Ser Phe His Arg Ile
165 170 175

Ile Ser Glu Asn Ile Glu Glu Phe Phe Cys Thr Met Asn Val Cys His
180 185 190

ES 2 629 252 T3

Val Ile Asn Asp Ala Ile Ala Val Ser Leu Thr Ser Lys Phe Ile Cys
 195 200 205

Glu Asn Asp Ser Ile Ser Leu Ile Ile Gly Thr Gly Thr Asn Ala Cys
 210 215 220

Phe Glu Val Pro Tyr Gly Tyr Leu Pro Pro Phe Lys Arg Asp Ala Leu
 225 230 235 240

Arg Glu Thr Leu Pro Ser Ser Tyr Asn Lys Glu Thr Leu Asn Phe Lys
 245 250 255

His Val Leu Ile Asn Ser Glu Ile Gly Phe Ile Gly Lys Asn Val Ile
 260 265 270

Ala Leu Gln Pro Phe Asp Ile His Gly Ala Ile Ser Tyr Glu Met Pro
 275 280 285

Leu Glu Cys Val Thr Ser Gly Lys Trp Leu Pro Leu Ser Leu Lys Asn
 290 295 300

Ile Leu Leu Gln Tyr Asn Ile Ile Pro Lys Asn Phe Pro Val Glu Phe
 305 310 315 320

Asn Gly Glu Leu Val Cys Gln Leu Ala Glu Asp Cys Thr Asn Ala Trp
 325 330 335

Phe Glu Asn Glu His Tyr Ala Leu Ile Cys Gln Ile Ala Arg Leu Leu
 340 345 350

Ile Lys Arg Ala Ala Phe Tyr Val Ala Ala Ile Val Gln Ala Ile Asp
 355 360 365

Ile Ile Thr Gly Cys Lys Asn Tyr Asn Phe Ile His Ile Gly Tyr Val
 370 375 380

Gly Ser Phe Leu His Asn Ser Asn Phe Tyr Arg Glu Gln Ile Lys Tyr
 385 390 395 400

Tyr Ser Ser Ile His Ile Lys Leu Gln Phe Leu Asn His Ser Asn Leu
 405 410 415

Leu Gly Ala Ala Ile Ala Thr Tyr Leu Asn Lys Ser Asp Asn Gln Val
 420 425 430

Gln

<210> 27

< 211> 64

< 212> ADN

5 < 213> ADN artificial

ES 2 629 252 T3

<220>
< 223> ADN sintético
<400> 27
taatatacct ctatacttta acgtcaagga gaaaaaacta taatgcagct gaagcttcgt 60
acgc 64

5 <210> 28
< 211> 66
< 212> ADN
< 213> ADN artificial
<220>

10 < 223> ADN sintético
<400> 28
aatgagaagt tgttctgaac aaagtaaaaa aaagaagtat acttacatag gccactagtg 60
gatctg 66
<210> 29
< 211> 25

15 < 212> ADN
< 213> ADN artificial
<220>
< 223> ADN sintético
<400> 29

20 atggcattat actcctgcta gaaag 25
<210> 30
< 211> 24
< 212> ADN
< 213> ADN artificial

25 <220>
< 223> ADN sintético
<400> 30

aaaggatggc agagcatggt atcg 24
 <210> 31
 < 211> 24
 < 212> ADN
 5 < 213> ADN artificial
 <220>
 < 223> ADN sintético
 <400> 31
 gattgcgaga tccacgaaat tacc 24
 10 <210> 32
 < 211> 24
 < 212> ADN
 < 213> ADN artificial
 <220>
 15 < 223> ADN sintético
 <400> 32
 aatcaccgga ttccttacca gttg 24
 <210> 33
 < 211> 25
 20 < 212> ADN
 < 213> ADN artificial
 <220>
 < 223> ADN sintético
 <400> 33
 25 gaaattcacg ggattattc gtgac 25
 <210> 34
 < 211> 25
 < 212> ADN

< 213> ADN artificial
 <220>
 < 223> ADN sintético
 <400> 34
 5 ttccatggt tctaagcgta gtgag 25
 <210> 35
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> ADN artificial
 10 <220>
 < 223> ADN sintético
 <400> 35
 cccgtttgtt ggaagatagc 20
 <210> 36
 15 < 211> 18
 < 212> ADN
 < 213> ADN artificial
 <220>
 < 223> ADN sintético
 20 <400> 36
 cacatcagcc atggaacc 18
 <210> 37
 < 211> 19
 < 212> ADN
 25 < 213> ADN artificial
 <220>
 < 223> ADN sintético
 <400> 37

gcaggtgctg ctgtattg 19
 <210> 38
 < 211> 21
 < 212> ADN
 5 < 213> ADN artificial
 <220>
 < 223> ADN sintético
 <400> 38
 ccgagctatc ctacgacttt c 21
 10 <210> 39
 < 211> 23
 < 212> ADN
 < 213> ADN artificial
 <220>
 15 < 223> ADN sintético
 <400> 39
 gcccgcacagg gtaacatatt atc 23
 <210> 40
 < 211> 23
 20 < 212> ADN
 < 213> ADN artificial
 <220>
 < 223> ADN sintético
 <400> 40
 25 ccggaatcat aggaagacct ttg 23
 <210> 41
 < 211> 24
 < 212> ADN

< 213> ADN artificial

<220>

< 223> ADN sintético

<400> 41

5 agaggaaggt gcactgaag attg 24

<210> 42

< 211> 24

< 212> ADN

< 213> ADN artificial

10 <220>

< 223> ADN sintético

<400> 42

ataagatgga attggccggt ctg 24

<210> 43

15 < 211> 1587

< 212> ADN

< 213> *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D

<400> 43

ES 2 629 252 T3

atgactaaat ctcattcaga agaagtgatt gtacctgagt tcaattctag cgcaaaggaa	60
ttaccaagac cattggccga aaagtgcccg agcataatta agaaatttat aagcgcttat	120
gatgctaaac cggatthttgt tgctagatcg cctggtagag tcaatctaata tggggaacat	180
attgattatt gtgacttctc ggttttacct ttagctattg attttgatat gctttgcgcc	240
gtcaaagttt tgaacgagaa aaatccatcc attaccttaa taaatgctga tcccaaattt	300
gctcaaagga agttcgattt gccgttggac ggttcttatg tcacaattga tccttctgtg	360
tcagactggt ctaattactt taaatgtggt ctccatggtg ctcaactctt tctaaagaaa	420
cttgaccggg aaaggthttgc cagtgtctct ctggccgggc tgcaagtctt ctgtgagggg	480
gatgtaccaa ctggcagtggt attgtcttct tcggccgcat tcatttgtgc cgttgcttta	540
gctgttgta aagcgaatat gggccctggt tatcatatgt ccaagcaaaa tttaatgcgt	600
atcacggtcg ttgcagaaca ttatgttgggt gtaacaatg gcggtatgga tcaggctgcc	660
tctgtttgcg gtgaggaaga tcatgctcta tacgttgagt tcaaaccgca gttgaaggct	720
actccgttta aatthccgca attaaaaaac catgaaatta gctttgttat tgccaacacc	780
cttgttgat ctaacaagtt tgaaaccgcc ccaaccaact ataatttaag agtggtagaa	840
gtcactacag ctgcaaatgt thtagctgcc acgtacggtg ttgtthtacc thctggaaaa	900
gaagatcga gcacgaataa aggtaatcta agagatttca tgaacgttta ttatgccaga	960
tatcacaaca thccacacc ctggaacggc gatattgaat ccggcatcga acggttaaca	1020
aagatgctag tactagttga agagtctctc gccataaga aacagggctt tagtgttgac	1080
gatgtcgcgc aatccttgaa ttgttctcgc gaagaattca caagagacta chtaacaaca	1140
tctccagtga gattthcaagt chtaagcta tatcagaggg ctaagcatgt gtattctgaa	1200
tctthaaagag tcttgaaggc tgtgaaatta atgactacag agagctthac tgccgatgaa	1260
gactthtca agcaatthg tgcttgatg aacgagtctc aagcttcttg cgataaactt	1320
tacgaatgth cttgtccaga gattgacaaa atthgttcca ttgctthgtc aatggatca	1380
tatgthtccc gthtgaccgg agctggctgg ggtgthtga ctgthcactt ggtthcaggg	1440
ggcccaaatg gcaacataga aaaggtaaaa gaagcccttg ccaatgagth ctacaaggth	1500
aagthacctta agatcactga tgctgagctt gaaaatgcta thatcgtctc thaaaccagca	1560
thgggcagct gthtatatga attataa	1587

<210> 44

5 < 211> 1587

< 212> ADN

< 213> Saccharomyces cerevisiae IMK318

<400> 44

ES 2 629 252 T3

atgactaaat ctcatcaga agaagtgatt gtacctgagt tcaattctag cgcaaaggaa 60
 ttaccaagac cattggccga aaagtgcccg agcataatta agaaatttat aagcgcttat 120
 gatgctaaac cggatthttgt tgctagatcg cctggtagag tcaatctaata tggatgaacat 180
 attgattatt gtgacttctc ggttttacct ttagctattg atthttgatat gctttgcgcc 240
 gtcaaagtht tgaacgagaa aaatccatcc attaccttaa taaatgctga tcccaaattt 300
 gctcaaagga agttcgatth gccgthtgac ggttcttatg tcacaattga tccttctgtg 360
 tcagactggt ctaattactt taaatgtggt ctccatgthg tccactctth tctaaagaaa 420
 cttgcaccgg aaaggtthtg cagtgcctct ctggccgggc tgcaagtctt ctgtgagggth 480
 gatgtacca aatggcagth attgtctctc tcggcccgcat tcattthgtc cgtthgctth 540
 gctgtthgta aagcgaatat gggccctggt tatcatatgt ccaagcaaaa thaatgcgt 600
 atcacgthc ttgcagaaca thattgthggt gthaaaatg gcggtatgga tcaggctgcc 660
 tctgthtgcg gtgaggaaga tcatgctcta tacgthgagt tcaaaccgca gthgaaggct 720
 actccgtht aaththcgca athaaaaaac catgaaatha gctthgtht tgcgaaacacc 780
 cthgthgth ctaacaagth tgaaaccgcc ccaaccaact athaththag agthgthgaa 840
 gthcactacag ctgcaaatgt thtagctgcc acgthcggth thgthththacc thctggaaaa 900
 gaagthcga gcacgaatha aggthaatcta agagaththc tgaacgtht thathgthcga 960
 thacacaaca ththccacacc ctggaaccgc gaththgath ccgthcathc acgththaca 1020
 aagthgthc tactagthg agagthctct gccaaatha aacagggct thagthgthgac 1080
 gathgthcgc aathctthg thgthctcgc gaagaathc caagagthc ththacaaca 1140
 thctccagth gaththcaagth ththaaagth thacagaggg thaaagthg thathctgaa 1200
 thctthaaag thctgaaagc thgthaaatha atgactacag agagctthth thcctgathgaa 1260
 gactththca agcaaththg thcctthgath aacgagthct aagctthctg cgataaactth 1320
 thacgaathg cthgthcaga gathgacaaa aththgthc thgctthgthc aathgathc 1380
 thagththcc gththgaccg agthgthgth gthgththg thgththcact gththcaggg 1440
 gthcccaath gcaacathg aaagthaaaa gaagccctth ccaathgath thacaagthc 1500

aagthaccct agathcactg thgthgagct gaaathgth thathgthct thaaaccagc 1560
 thgggthcag thctaththg aththataa 1587

<210> 45

5 < 211> 1587

< 212> ADN

< 213> *Saccharomyces cerevisiae* IMW017

<400> 45

ES 2 629 252 T3

atgactaaat ctcatcaga agaagtgatt gtacctgagt tcaattctag cgcaaaggaa 60
 ttaccaagac cattggccga aaagtgcccg agcataatta agaaatttat aagcgcttat 120
 gatgctaaac cggatthttgt tgctagatcg cctggtagag tcaatctaata tggatgaacat 180
 attgattatt gtgacttctc ggttttacct ttagctattg atthttgatat gctttgcgcc 240
 gtcaaagtht tgaacgagaa aaatccatcc attaccttaa taaatgctga tcccaaattt 300
 gctcaaagga agttcgattt gccgttgac ggttcttatg tcacaattga tccttctgtg 360
 tcagactggt ctaattactt taaatgtggt ctccatggtg ctcaactctt tctaaagaaa 420
 cttgcaccgg aaaggthttgc cagtgtctct ctggccgggc tgcaagtctt ctgtgaggggt 480
 gatgtaccaa ctggcagtggt attgtcttct tcggccgcat tcattthgtg cgttgcttta 540
 gctgttgtha aagcgaatat gggccctggt tatcatatgt ccaagcaaaa thaatgcgt 600
 atcacggtcg ttgcagaaca ttatgttggt gtaacaatg gcggtatgga tcaggctgcc 660
 tctgthtgcg gtgaggaaga tcatgtctta tacgttgagt tcaaaccgca gttgaaggct 720
 actccgthta aaththcgca attaaaaaac catgaaatta gctthgthta tgccaacacc 780
 cthgttgtha ctaacaagth tgaaaccgcc ccaaccaact thaatthaa agtggtagaa 840
 gtcactacag ctgcaaatgt thtagctgcc acgtacggtg thgththacc thctggaaaa 900
 gaagatoga gcaagaaata aggtaatcta agagaththca tgaacgthta thtagccaga 960
 taccacaaca ththcacacc ctggaacggc gatathgaat ccggcatcga accgthtaaca 1020
 aagatgctag tactagthga agagtctctc gccaaataaga aacagggtct tagtgthgac 1080
 gatgtcgccg aatcctthga thgttctcgc gaagaathca caagagtcta cthtaacaaca 1140
 ththcagtha gaththcaagth cthaaagcta taccagaggg cthaaagatg thaththgaa 1200
 thththaaag ththgaaggc thtgaaatha atgactacag agagctthac thccgatgaa 1260
 gactththca agcaaththg thcctthgat aacgagthct aagctthctg cgataaacth 1320
 tacgaatgth cthgtccaga gaththgaaaa atthgtthca thgctthgthc aathgathca 1380
 thtgththcc gththgaccg agctggctgg ggtgththga ctgthcacth gththccaggg 1440
 ggcchaaatg gcaacathga aaaggthaaa gaagccctth ccaathgagth ctacaaggthc 1500
 aagthacccta agathcactga thgtgagcth gaaathgtha thathgthct thaaaccagca 1560

 thgggcagct gththathga aththaa 1587

<210> 46

5 < 211> 1587

< 212> ADN

< 213> *Saccharomyces cerevisiae* IMW018

<400> 46

ES 2 629 252 T3

atgactaaat ctcatcaga agaagtgatt gtacctgagt tcaattctag cgcaaaggaa 60
 ttaccaagac cattggccga aaagtgccg agcataatta agaaatttat aagcgcttat 120
 gatgctaaac cggatthttgt tgctagatcg cctggtagag tcaatctaata tgggtaacat 180
 attgattatt gtgacttctc ggthttacct ttagctattg atthttgatat gctthtgccc 240
 gtcaaagtht tgaacgagaa aaatccatcc attaccttaa taaatgctga tcccaaattt 300
 gctcaaagga agttcgatth gccgthtgac ggtthcttatg tcacaattga tctthctgtg 360
 tcagactggt ctaattactt taaatgtggt ctccatgthg ctcaactctt tctaaagaaa 420
 cthgaccgg aaagthttgc cagthgctct ctggccgggc tgcaagthct ctgthgaggt 480
 gatgtaccaa ctggcagthg atthgthctct tcggccgcat tcaattthgth cgtthgcttha 540
 gctgthgtha aagcgaatat gggccctggt tatcatatgt ccaagcaaaa thtaathgct 600
 atcacgthc thgcagaaca ththgthggt gthaaacatg gcgthgthg tcaagthgct 660
 thgththgct gthgaggaaga thctgthct tathgthgth tcaaacgca gthgaggt 720
 actcctthta aaththcgc athaaaaaac catgaaatha gctthgthta thgcgaacacc 780
 cthgthgth ctaacaagth thgaaaccgct ccaaccaact athaaththg agthgthgaa 840
 gthcaactac ctgcaaatgt ththgctgct acgthcggth thgthththacc thctggaaaa 900
 gaagthcga gthcgaatha aggthaatct agagththca thgacgthth ththgthcga 960
 ththcaaca ththcacacc ctggaaccgct gatathgath ccgthcctga accgththca 1020
 aagthgctg thctagthth agagthctct gccaaatha aacagggct thgthgthg 1080
 gatthcgcgc aathctthg ththctctgc gaagaathca caagthct cththcaaca 1140
 thctcagth gaththcaag ththaaagct thctagaggt cthagctgth gththctgaa 1200
 thththagag ththgaggt thgthaaatha atgactacag agagctthth thcctgthgaa 1260
 gctthththca agcaaththg thcctthgth aacgthctc aagctthctg cgataaacth 1320
 thcgaathg ththgthcga gathgacaaa atthgthth thgctthgth aathgthca 1380
 ththgthctc gththgaccg agthgctgth gthgthgth thgthctct gththcaggt 1440
 gthccaaath gthcaactaga aaagthaaaa gaagccctg ccaathgth ctacaaggtc 1500
 aagthcctc agthcactga thgthgctgth gaaathgth ththctgthct thaaaccgca 1560
 thgggctgct gthctatgth atthataa 1587

<210> 47

< 211> 1725

< 212> ADN

5 < 213> *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D

<400> 47

ES 2 629 252 T3

atggcagttg aggagaacaa tatgcctggt gtttcacagc aacccaagc tggggaagac 60
gtgatctctt cactcagtaa agattcccat ttaagcgac aatctcaaaa gtattccaat 120
gatgaattga aagccgggta gtcagggcct gaaggctccc aaagtgttcc tatagagata 180
ccaagaagc ccatgtctga atatgttacc gtttccttgc tttgtttggtg tgttgccttc 240
ggcggcttca tgtttggctg ggataccggt actatttctg ggtttgttgt ccaaacagac 300
tttttgagaa ggtttggtat gaaacataag gatggtacc actatttgtc aaacgtcaga 360
acaggtttaa tcgtcgccat tttcaatatt ggctgtgcct ttggtggtat tatactttcc 420
aaaggtggag atatgtatgg ccgtaaaaag ggtctttcga ttgtcgtctc ggtttatata 480
gttggtatta tcattcaaat tgcctctatc aacaagtggg accaatattt cattggtaga 540
atcatatctg gtttgggtgt cggcggcatc gccgtcttat gtccatggt gatctctgaa 600
attgctcaa agcacttgag aggcacacta gtttcttgtt atcagctgat gattactgca 660
ggtatctttt tgggctactg tactaattac ggtacaaaga gctattcgaa ctcagttcaa 720
tggagagttc cattagggct atgtttcgct tggtcattat ttatgattgg cgctttgacg 780
ttagttcctg aatccccacg ttatttatgt gaggtgaata aggtagaaga cgccaagctt 840
tccattgcta agtctaacaa ggtgtcacca gaggatcctg ccgtccaggc agagttagat 900
ctgatcatgg ccggtataga agctgaaaa ctggctggca atgcgtcctg gggggaatta 960
ttttccacca agaccaaagt atttcaacgt ttgttgatgg gtgtatttgt tcaaagttc 1020
caacaattaa ccgtaacaa ttatTTTTTt tactacggta ccgttatttt caagttagtt 1080
ggcctggatg attcctttga aacatccatt gtcatgggtg tagtcaactt tgcctccact 1140
ttctttagtt tgtggactgt cgaaaacttg gggcgtgta aatgtttact tttggcgct 1200
gccactatga tggcttgtat ggtcatctac gcctctgttg gtgttaccag attatacct 1260
cacggtaaaa gccagccatc ttctaaaggt gccggtaact gtatgattgt ctttacctgt 1320
ttttatattt tctgttatgc cacaacctgg gcgccagttg cctgggtcat cacagcagaa 1380
tcattcccac tgagagtcaa gtcgaaatgt atggcgttgg cctctgcttc caattgggta 1440
tgggggttct tgattgcatt tttcacccca ttcatcacat ctgccattaa cttctactac 1500
ggttatgtct tcatgggctg tttggttgcc atgtttttt atgtctttt ctttgttcca 1560
gaaactaaag gcctatcgtt agaagaaatt caagaattat gggaagaag tgttttacct 1620
tggaaatctg aaggctggat tccttcatcc agaagaggta ataattacga tttagaggat 1680

ttacaacatg acgacaaacc gtggtacaag gccatgctag aataa 1725

<210> 48

5 <211> 1725

<212> ADN

ES 2 629 252 T3

< 213> Saccharomyces cerevisiae IMK318

<400> 48

atggcagttg aggagaacaa tatgcctggt gtttcacagc aacccaagc tggatgaagac	60
gtgatctctt cactcagtaa agattcccat ttaagcgac aatctcaaaa gtattccaat	120
gatgaattga aagccggtga gtcagggcct gaaggctccc aaagtgttcc tatagagata	180
ccaagaagc ccatgtctga atatgttacc gtttccttgc tttgtttgtg tgttgccttc	240
ggcggcttca tgtttggctg ggataccggt actatttctg ggtttgttgt ccaaacagac	300
tttttgagaa ggtttggtat gaaacataag gatggtacc actatttgtc aaacgtcaga	360
acaggtttaa tcgtcgccat tttcaatatt ggctgtgcct ttggtggtat tatactttcc	420
aaagtgagg atagtgtatg ccgtaaaaag ggtctttcga ttgtcgtctc ggtttatata	480
gttggtatta tcattcaaat tgcctctatc aacaagtgg accaatattt cattggtaga	540
atcatatctg gtttgggtgt cggcggcatc gccgtcttat gtcctatgtt gatctctgaa	600
attgctcaa agcacttgag aggcacacta gtttcttgtt atcagctgat gattactgca	660
ggtatctttt tgggctactg tactaattac ggtacaaaga gctattcgaa ctcagttcaa	720
tggagagttc cattagggct atgtttcgtc tggtcattat ttatgattgg cgctttgacg	780
ttagttcctg aatccccacg ttatttatgt gaggtgaata aggtagaaga cgccaagctt	840
tccattgcta agtctaacaa ggtgtcacca gaggatcctg ccgtccaggc agagttagat	900
ctgatcatgg ccggtataga agctgaaaa ctggctggca atgcgtcctg gggggaatta	960
ttttccacca agaccaaagt atttcaacgt ttgttgatgg gtgtatttgt tcaaatgttc	1020
caacaattaa ccggtacaa ttattttttc tactacggta ccgttatttt caagttagtt	1080
ggcctggatg attcctttga aacatccatt gtcattgggt tagtcaactt tgcctccact	1140
ttctttagtt tgtggactgt cgaaaacttg gggcgtcgt aatgtttact tttggcgtc	1200
gccactatga tggcttgtat ggtcatctac gcctctgttg gtgttaccag attatctct	1260
cacggtaaaa gccagccatc ttctaaaggt gccggtaact gtatgattgt ctttacctgt	1320
ttttatattt tctgttatgc cacaacctgg gcgccagttg cctgggtcat cacagcagaa	1380
tcattcccac tgagagtcaa gtcgaaatgt atggcgttgg cctctgcttc caattgggta	1440
tgggggttct tgattgcatt tttcaccoca ttcatcacat ctgccattaa cttctactac	1500
ggttatgtct tcatgggctg tttggttgcc atgtttttt atgtctttt ctttgttcca	1560
gaaactaaag gcctatcgtt agaagaaatt caagaattat ggaagaagg tgttttacct	1620
tggaaatctg aaggctggat tccttcatcc agaagaggta ataattacga tttagaggat	1680
5 ttacaacatg acgacaaacc gtggtacaag gccatgctag aataa	1725

<210> 49

< 211> 1725

ES 2 629 252 T3

< 212> ADN

< 213> *Saccharomyces cerevisiae* IMW017

<400> 49

atggcagttg aggagaacaa tatgcctggt gtttcacagc aacccaagc tggggaagac	60
gtgatctctt cactcagtaa agattcccat ttaagcgac aatctcaaaa gtattccaat	120
gatgaattga aagccggtga gtcagggcct gaaggctccc aaagtgttcc tatagagata	180
ccaagaagc ccatgtctga atatgttacc gtttccttgc tttgtttgtg tgttgccttc	240
ggcggcttca tgtttggctg ggataccggt actatttctg ggtttgttgt ccaaacagac	300
tttttgagaa ggtttgggat gaaacataag gatggtacc actatttgtc aaacgtcaga	360
acaggttaa tcgtcgccat tttcaatatt ggctgtgcct ttggtggat tatactttcc	420
aaagtgagg atagtgtatg ccgtaaaaag ggtctttcga ttgtcgtctc ggtttatata	480
gttggtatta tcattcaaat tgcctctatc aacaagtggt accaatattt cattggtaga	540
atcatatctg gtttgggtgt cggcggcatc gccgtcttat gtcctatgtt gatctctgaa	600
attgctcaa agcacttgag aggcacacta gtttcttgtt atcagctgat gattaatgca	660
ggtatctttt tgggctactg tactaattac ggtacaaaga gctattcgaa ctcagttcaa	720
tggagagttc cattagggct atgtttcgtc tggtcattat ttatgattgg cgctttgacg	780
ttagttcctg aatccccacg ttatttatgt gaggtgaata aggtagaaga cgccaagctt	840
tccattgcta agtctaacaa ggtgtcacca gaggatcctg ccgtccaggc agagttagat	900
ctgatcatgg ccggtataga agctgaaaa ctggctggca atgcgtcctg gggggaatta	960
ttttccacca agaccaaagt atttcaacgt ttgttgatgg gtgtatttgt tcaaatgttc	1020
caacaattaa ccgtaacaa ttattttttc tactacggta ccgttatttt caagtcaagt	1080
ggcctggatg attcctttga aacatccatt gtcattgggt tagtcaactt tgcctccact	1140
ttctttagtt tgtggactgt cgaaaacttg gggcgtcgt aatgtttact tttggcgtc	1200
gccactatga tggcttgtat ggtcatctac gcctctgttg gtgttaccag attatctct	1260
cacggtaaaa gccagccatc ttctaaaggt gccgtaact gtatgattgt ctttacctgt	1320
ttttatattt tctgttatgc cacaacctgg gcgccagttg cctgggtcat cacagcagaa	1380
tcattcccac tgagagtcaa gtcgaaatgt atggcgttgg cctctgcttc caattgggta	1440
tgggggttct tgattgcatt tttcacccca ttcatcacat ctgccattaa cttctactac	1500
ggttatgtct tcatgggctg tttggttgcc atgttttttt atgtcttttt ctttgttcca	1560
5	
gaaactaaag gcctatcgtt agaagaaatt caagaattat gggaagaag tgttttacct	1620
tggaaatctg aagctggat tccttcatcc agaagaggta ataattacga tttagaggat	1680
ttacaacatg acgacaaacc gtggtacaag gccatgctag aataa	1725

<210> 50

ES 2 629 252 T3

< 211> 1725

< 212> ADN

< 213> Saccharomyces cerevisiae IMW018

<400> 50

atggcagttg aggagaacaa tatgcctggt gtttcacagc aaccccaagc tggatgaagac	60
gtgatctctt cactcagtaa agattcccat ttaagcgac aatctcaaaa gtattccaat	120
gatgaattga aagccggtga gtcagggcct gaaggctccc aaagtgttcc tatagagata	180
ccaagaagc ccatgtctga atatgttacc gtttccttgc tttgtttgtg tgttgccttc	240
ggcggcttca tgtttggctg ggataccggt actatttctg ggtttggtgt ccaaacagac	300
tttttgagaa ggtttggtat gaaacataag gatggtacct actatttgtc aaacgtcaga	360
acaggtttaa tcgtcgccat tttcaatatt ggctgtgcct ttggtggtat tatactttcc	420
aaagtggtgag atatgtatgg ccgtaaaaag ggtctttcga ttgtcgtctc ggtttatata	480
gttggtatta tcattcaaat tgcctctatc aacaagtggg accaatatth cattggtaga	540
atcatatctg gtttgggtgt cggcggcatc gccgtcttat gtcctatggt gatctctgaa	600
attgctccaa agcacttgag aggcacacta gtttcttgtt atcagctgat gattactgca	660
ggtatctttt tgggctactg tactaattac ggtacaaaga gctattcgaa ctcaagtcaa	720
tggagagttc cattagggct atgtttcgct tggtcattat ttatgattgg cgctttgacg	780
ttagttcctg aatccccacg ttatthtatgt gaggtgaata aggtagaaga cgccaagctt	840
tccattgcta agtctaacaa ggtgtcacca gaggatcctg ccgtccaggc agagttagat	900
ctgatcatgg ccggtataga agctgaaaa ctggctggca atgcgtcctg gggggaatta	960
ttttccacca agaccaaagt atttcaacgt ttgttgatgg gtgtatthgt tcaaatgttc	1020
caacaattaa ccggtacaa ttatthtttc tactacggta ccgttattht caagtcaagt	1080
ggcctggatg attcctthga aacatccatt gtcattgggt tagtcagctt tgcctccact	1140
ttctthagtt tgtggactgt cgaaaacttg gggcgtcgt aatgthtact tttggcgct	1200
gccactatga tggcttgtat ggtcatctac gcctctgttg gtgttaccag attatathct	1260
cacggtaaaa gccagccatc ttctaaaggt gccgtaact gtatgattgt cthtacctgt	1320
ttttatatht tctgttatgc cacaacctgg gcgccagttg cctgggtcat cacagcagaa	1380
tcattcccac tgagagtcaa gtcgaaatgt atggcgttgg cctctgcttc caattgggta	1440
5 tgggggttct tgattgcatt tttcacccca ttcatcacat ctgccattaa cthctactac	1500
ggttatgtct tcattgggctg tttggttgcc atgtthtttt atgtctthtt cthttgtcca	1560
gaaactaaag gcctatcgtt agaagaaatt caagaattat ggaagaagg tgtthtacct	1620
tggaaatctg aaggctggat tccttcatcc agaagaggta ataattacga tthtagaggat	1680
ttacaacatg acgacaaacc gtggtacaag gccatgctag aataa	1725

ES 2 629 252 T3

<210> 51

< 211> 528

< 212> PRT

< 213> Saccharomyces cerevisiae CEN.PK 113-7D

5 <400> 51

Met Thr Lys Ser His Ser Glu Glu Val Ile Val Pro Glu Phe Asn Ser
1 5 10 15

Ser Ala Lys Glu Leu Pro Arg Pro Leu Ala Glu Lys Cys Pro Ser Ile
20 25 30

Ile Lys Lys Phe Ile Ser Ala Tyr Asp Ala Lys Pro Asp Phe Val Ala
35 40 45

Arg Ser Pro Gly Arg Val Asn Leu Ile Gly Glu His Ile Asp Tyr Cys
50 55 60

Asp Phe Ser Val Leu Pro Leu Ala Ile Asp Phe Asp Met Leu Cys Ala
65 70 75 80

Val Lys Val Leu Asn Glu Lys Asn Pro Ser Ile Thr Leu Ile Asn Ala
85 90 95

Asp Pro Lys Phe Ala Gln Arg Lys Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gly Ser
100 105 110

Tyr Val Thr Ile Asp Pro Ser Val Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Phe Lys
115 120 125

Cys Gly Leu His Val Ala His Ser Phe Leu Lys Lys Leu Ala Pro Glu
130 135 140

Arg Phe Ala Ser Ala Pro Leu Ala Gly Leu Gln Val Phe Cys Glu Gly
145 150 155 160

Asp Val Pro Thr Gly Ser Gly Leu Ser Ser Ser Ala Ala Phe Ile Cys
165 170 175

Ala Val Ala Leu Ala Val Val Lys Ala Asn Met Gly Pro Gly Tyr His
180 185 190

ES 2 629 252 T3

Met Ser Lys Gln Asn Leu Met Arg Ile Thr Val Val Ala Glu His Tyr
 195 200 205

Val Gly Val Asn Asn Gly Gly Met Asp Gln Ala Ala Ser Val Cys Gly
 210 215 220

Glu Glu Asp His Ala Leu Tyr Val Glu Phe Lys Pro Gln Leu Lys Ala
 225 230 235 240

Thr Pro Phe Lys Phe Pro Gln Leu Lys Asn His Glu Ile Ser Phe Val
 245 250 255

Ile Ala Asn Thr Leu Val Val Ser Asn Lys Phe Glu Thr Ala Pro Thr
 260 265 270

Asn Tyr Asn Leu Arg Val Val Glu Val Thr Thr Ala Ala Asn Val Leu
 275 280 285

Ala Ala Thr Tyr Gly Val Val Leu Pro Ser Gly Lys Glu Gly Ser Ser
 290 295 300

Thr Asn Lys Gly Asn Leu Arg Asp Phe Met Asn Val Tyr Tyr Ala Arg
 305 310 315 320

Tyr His Asn Ile Ser Thr Pro Trp Asn Gly Asp Ile Glu Ser Gly Ile
 325 330 335

Glu Arg Leu Thr Lys Met Leu Val Leu Val Glu Glu Ser Leu Ala Asn
 340 345 350

Lys Lys Gln Gly Phe Ser Val Asp Asp Val Ala Gln Ser Leu Asn Cys
 355 360 365

Ser Arg Glu Glu Phe Thr Arg Asp Tyr Leu Thr Thr Ser Pro Val Arg
 370 375 380

Phe Gln Val Leu Lys Leu Tyr Gln Arg Ala Lys His Val Tyr Ser Glu
 385 390 395 400

Ser Leu Arg Val Leu Lys Ala Val Lys Leu Met Thr Thr Glu Ser Phe
 405 410 415

Thr Ala Asp Glu Asp Phe Phe Lys Gln Phe Gly Ala Leu Met Asn Glu
 420 425 430

Ser Gln Ala Ser Cys Asp Lys Leu Tyr Glu Cys Ser Cys Pro Glu Ile

ES 2 629 252 T3

Phe Gln Val Leu Lys Leu Tyr Gln Arg Ala Lys His Val Tyr Ser Glu
385 390 395 400

Ser Leu Arg Val Leu Lys Ala Val Lys Leu Met Thr Thr Glu Ser Phe
405 410 415

Thr Ala Asp Glu Asp Phe Phe Lys Gln Phe Gly Ala Leu Met Asn Glu
420 425 430

Ser Gln Ala Ser Cys Asp Lys Leu Tyr Glu Cys Ser Cys Pro Glu Ile
435 440 445

Asp Lys Ile Cys Ser Ile Ala Leu Ser Asn Gly Ser Tyr Gly Ser Arg
450 455 460

Leu Thr Gly Ala Gly Trp Gly Gly Cys Thr Val His Leu Val Pro Gly
465 470 475 480

Gly Pro Asn Gly Asn Ile Glu Lys Val Lys Glu Ala Leu Ala Asn Glu
485 490 495

Phe Tyr Lys Val Lys Tyr Pro Lys Ile Thr Asp Ala Glu Leu Glu Asn
500 505 510

Ala Ile Ile Val Ser Lys Pro Ala Leu Gly Ser Cys Leu Tyr Glu Leu
515 520 525

<210> 53

< 211> 528

< 212> PRT

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae IMW017

<400> 53

Met Thr Lys Ser His Ser Glu Glu Val Ile Val Pro Glu Phe Asn Ser
1 5 10 15

Ser Ala Lys Glu Leu Pro Arg Pro Leu Ala Glu Lys Cys Pro Ser Ile
20 25 30

Ile Lys Lys Phe Ile Ser Ala Tyr Asp Ala Lys Pro Asp Phe Val Ala
35 40 45

Arg Ser Pro Gly Arg Val Asn Leu Ile Gly Glu His Ile Asp Tyr Cys
50 55 60

Asp Phe Ser Val Leu Pro Leu Ala Ile Asp Phe Asp Met Leu Cys Ala
65 70 75 80

ES 2 629 252 T3

Val Lys Val Leu Asn Glu Lys Asn Pro Ser Ile Thr Leu Ile Asn Ala
85 90 95

Asp Pro Lys Phe Ala Gln Arg Lys Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gly Ser
100 105 110

Tyr Val Thr Ile Asp Pro Ser Val Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Phe Lys
115 120 125

Cys Gly Leu His Val Ala His Ser Phe Leu Lys Lys Leu Ala Pro Glu
130 135 140

Arg Phe Ala Ser Ala Pro Leu Ala Gly Leu Gln Val Phe Cys Glu Gly
145 150 155 160

Asp Val Pro Thr Gly Ser Gly Leu Ser Ser Ser Ala Ala Phe Ile Cys
165 170 175

Ala Val Ala Leu Ala Val Val Lys Ala Asn Met Gly Pro Gly Tyr His
180 185 190

Met Ser Lys Gln Asn Leu Met Arg Ile Thr Val Val Ala Glu His Tyr
195 200 205

Val Gly Val Asn Asn Gly Gly Met Asp Gln Ala Ala Ser Val Cys Gly
210 215 220

Glu Glu Asp His Ala Leu Tyr Val Glu Phe Lys Pro Gln Leu Lys Ala
225 230 235 240

Thr Pro Phe Lys Phe Pro Gln Leu Lys Asn His Glu Ile Ser Phe Val
245 250 255

Ile Ala Asn Thr Leu Val Val Ser Asn Lys Phe Glu Thr Ala Pro Thr
260 265 270

Asn Phe Asn Leu Arg Val Val Glu Val Thr Thr Ala Ala Asn Val Leu
275 280 285

Ala Ala Thr Tyr Gly Val Val Leu Pro Ser Gly Lys Glu Gly Ser Ser
290 295 300

Thr Asn Lys Gly Asn Leu Arg Asp Phe Met Asn Val Tyr Tyr Ala Arg
305 310 315 320

Tyr His Asn Ile Ser Thr Pro Trp Asn Gly Asp Ile Glu Ser Gly Ile
325 330 335

ES 2 629 252 T3

Glu Arg Leu Thr Lys Met Leu Val Leu Val Glu Glu Ser Leu Ala Asn
 340 345 350

Lys Lys Gln Gly Phe Ser Val Asp Asp Val Ala Gln Ser Leu Asn Cys
 355 360 365

Ser Arg Glu Glu Phe Thr Arg Val Tyr Leu Thr Thr Ser Pro Val Arg
 370 375 380

Phe Gln Val Leu Lys Leu Tyr Gln Arg Ala Lys His Val Tyr Ser Glu
 385 390 395 400

Ser Leu Arg Val Leu Lys Ala Val Lys Leu Met Thr Thr Glu Ser Phe
 405 410 415

Thr Ala Asp Glu Asp Phe Phe Lys Gln Phe Gly Ala Leu Met Asn Glu
 420 425 430

Ser Gln Ala Ser Cys Asp Lys Leu Tyr Glu Cys Ser Cys Pro Glu Ile
 435 440 445

Asp Lys Ile Cys Ser Ile Ala Leu Ser Asn Gly Ser Tyr Gly Ser Arg
 450 455 460

Leu Thr Gly Ala Gly Trp Gly Gly Cys Thr Val His Leu Val Pro Gly
 465 470 475 480

Gly Pro Asn Gly Asn Ile Glu Lys Val Lys Glu Ala Leu Ala Asn Glu
 485 490 495

Phe Tyr Lys Val Lys Tyr Pro Lys Ile Thr Asp Ala Glu Leu Glu Asn
 500 505 510

Ala Ile Ile Val Ser Lys Pro Ala Leu Gly Ser Cys Leu Tyr Glu Leu
 515 520 525

<210> 54

< 211> 528

< 212> PRT

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae IMW018

<400> 54

Met Thr Lys Ser His Ser Glu Glu Val Ile Val Pro Glu Phe Asn Ser
 1 5 10 15

Ser Ala Lys Glu Leu Pro Arg Pro Leu Ala Glu Lys Cys Pro Ser Ile
 20 25 30

ES 2 629 252 T3

Ile Lys Lys Phe Ile Ser Ala Tyr Asp Ala Lys Pro Asp Phe Val Ala
 35 40 45

Arg Ser Pro Gly Arg Val Asn Leu Ile Gly Glu His Ile Asp Tyr Cys
 50 55 60

Asp Phe Ser Val Leu Pro Leu Ala Ile Asp Phe Asp Met Leu Cys Ala
 65 70 75 80

Val Lys Val Leu Asn Glu Lys Asn Pro Ser Ile Thr Leu Ile Asn Ala
 85 90 95

Asp Pro Lys Phe Ala Gln Arg Lys Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gly Ser
 100 105 110

Tyr Val Thr Ile Asp Pro Ser Val Ser Asp Trp Ser Asn Tyr Phe Lys
 115 120 125

Cys Gly Leu His Val Ala His Ser Phe Leu Lys Lys Leu Ala Pro Glu
 130 135 140

Arg Phe Ala Ser Ala Pro Leu Ala Gly Leu Gln Val Phe Cys Glu Gly
 145 150 155 160

Asp Val Pro Thr Gly Ser Gly Leu Ser Ser Ser Ala Ala Phe Ile Cys
 165 170 175

Ala Val Ala Leu Ala Val Val Lys Ala Asn Met Gly Pro Gly Tyr His
 180 185 190

Met Ser Lys Gln Asn Leu Met Arg Ile Thr Val Val Ala Glu His Tyr
 195 200 205

Val Gly Val Asn Asn Gly Gly Met Asp Gln Ala Ala Ser Val Cys Gly
 210 215 220

Glu Glu Asp His Ala Leu Tyr Val Glu Phe Lys Pro Gln Leu Lys Ala
 225 230 235 240

Thr Pro Phe Lys Phe Pro Gln Leu Lys Asn His Glu Ile Ser Phe Val
 245 250 255

Ile Ala Asn Thr Leu Val Val Ser Asn Lys Phe Glu Thr Ala Pro Thr
 260 265 270

Asn Tyr Asn Leu Arg Val Val Glu Val Thr Thr Ala Ala Asn Val Leu
 275 280 285

ES 2 629 252 T3

Ala Ala Thr Tyr Gly Val Val Leu Pro Ser Gly Lys Glu Gly Ser Ser
 290 295 300

Thr Asn Lys Gly Asn Leu Arg Asp Phe Met Asn Val Tyr Tyr Ala Arg
 305 310 315 320

Tyr His Asn Ile Ser Thr Pro Trp Asn Gly Asp Ile Glu Ser Gly Ile
 325 330 335

Glu Arg Leu Thr Lys Met Leu Val Leu Val Glu Glu Ser Leu Ala Asn
 340 345 350

Lys Lys Gln Gly Phe Ser Val Asp Asp Val Ala Gln Ser Leu Asn Cys
 355 360 365

Ser Arg Glu Glu Phe Thr Arg Val Tyr Leu Thr Thr Ser Pro Val Arg
 370 375 380

Phe Gln Val Leu Lys Leu Tyr Gln Arg Ala Lys His Val Tyr Ser Glu
 385 390 395 400

Ser Leu Arg Val Leu Lys Ala Val Lys Leu Met Thr Thr Glu Ser Phe
 405 410 415

Thr Ala Asp Glu Asp Phe Phe Lys Gln Phe Gly Ala Leu Met Asn Glu
 420 425 430

Ser Gln Ala Ser Cys Asp Lys Leu Tyr Glu Cys Ser Cys Pro Glu Ile
 435 440 445

Asp Lys Ile Cys Ser Ile Ala Leu Ser Asn Gly Ser Tyr Gly Ser Arg
 450 455 460

Leu Thr Gly Ala Gly Trp Gly Gly Cys Thr Val His Leu Val Pro Gly
 465 470 475 480

Gly Pro Asn Gly Asn Ile Glu Lys Val Lys Glu Ala Leu Ala Asn Glu
 485 490 495

Phe Tyr Lys Val Lys Tyr Pro Lys Ile Thr Asp Ala Glu Leu Glu Asn
 500 505 510

Ala Ile Ile Val Ser Lys Pro Ala Leu Gly Ser Cys Leu Tyr Glu Leu
 515 520 525

<210> 55

< 211> 574

< 212> PRT

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae CEN.PK 113-7D

<400> 55

ES 2 629 252 T3

Met Ala Val Glu Glu Asn Asn Met Pro Val Val Ser Gln Gln Pro Gln
 1 5 10 15

Ala Gly Glu Asp Val Ile Ser Ser Leu Ser Lys Asp Ser His Leu Ser
 20 25 30

Ala Gln Ser Gln Lys Tyr Ser Asn Asp Glu Leu Lys Ala Gly Glu Ser
 35 40 45

Gly Pro Glu Gly Ser Gln Ser Val Pro Ile Glu Ile Pro Lys Lys Pro
 50 55 60

Met Ser Glu Tyr Val Thr Val Ser Leu Leu Cys Leu Cys Val Ala Phe
 65 70 75 80

Gly Gly Phe Met Phe Gly Trp Asp Thr Gly Thr Ile Ser Gly Phe Val
 85 90 95

Val Gln Thr Asp Phe Leu Arg Arg Phe Gly Met Lys His Lys Asp Gly
 100 105 110

Thr His Tyr Leu Ser Asn Val Arg Thr Gly Leu Ile Val Ala Ile Phe
 115 120 125

Asn Ile Gly Cys Ala Phe Gly Gly Ile Ile Leu Ser Lys Gly Gly Asp
 130 135 140

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Gly Leu Ser Ile Val Val Ser Val Tyr Ile
 145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ile Gln Ile Ala Ser Ile Asn Lys Trp Tyr Gln Tyr
 165 170 175

Phe Ile Gly Arg Ile Ile Ser Gly Leu Gly Val Gly Gly Ile Ala Val
 180 185 190

Leu Cys Pro Met Leu Ile Ser Glu Ile Ala Pro Lys His Leu Arg Gly
 195 200 205

Thr Leu Val Ser Cys Tyr Gln Leu Met Ile Thr Ala Gly Ile Phe Leu
 210 215 220

Gly Tyr Cys Thr Asn Tyr Gly Thr Lys Ser Tyr Ser Asn Ser Val Gln

ES 2 629 252 T3

Trp Gly Phe Leu Ile Ala Phe Phe Thr Pro Phe Ile Thr Ser Ala Ile
 485 490 495

Asn Phe Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Met Gly Cys Leu Val Ala Met Phe
 500 505 510

Phe Tyr Val Phe Phe Phe Val Pro Glu Thr Lys Gly Leu Ser Leu Glu
 515 520 525

Glu Ile Gln Glu Leu Trp Glu Glu Gly Val Leu Pro Trp Lys Ser Glu
 530 535 540

Gly Trp Ile Pro Ser Ser Arg Arg Gly Asn Asn Tyr Asp Leu Glu Asp
 545 550 555 560

Leu Gln His Asp Asp Lys Pro Trp Tyr Lys Ala Met Leu Glu
 565 570

<210> 56

< 211> 574

< 212> PRT

5 < 213> Saccharomyces cerevisiae IMK318

<400> 56

Met Ala Val Glu Glu Asn Asn Met Pro Val Val Ser Gln Gln Pro Gln
 1 5 10 15

Ala Gly Glu Asp Val Ile Ser Ser Leu Ser Lys Asp Ser His Leu Ser
 20 25 30

Ala Gln Ser Gln Lys Tyr Ser Asn Asp Glu Leu Lys Ala Gly Glu Ser
 35 40 45

Gly Pro Glu Gly Ser Gln Ser Val Pro Ile Glu Ile Pro Lys Lys Pro
 50 55 60

Met Ser Glu Tyr Val Thr Val Ser Leu Leu Cys Leu Cys Val Ala Phe
 65 70 75 80

Gly Gly Phe Met Phe Gly Trp Asp Thr Gly Thr Ile Ser Gly Phe Val
 85 90 95

Val Gln Thr Asp Phe Leu Arg Arg Phe Gly Met Lys His Lys Asp Gly
 100 105 110

Thr His Tyr Leu Ser Asn Val Arg Thr Gly Leu Ile Val Ala Ile Phe
 115 120 125

ES 2 629 252 T3

Asn Ile Gly Cys Ala Phe Gly Gly Ile Ile Leu Ser Lys Gly Gly Asp
 130 135 140

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Gly Leu Ser Ile Val Val Ser Val Tyr Ile
 145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ile Gln Ile Ala Ser Ile Asn Lys Trp Tyr Gln Tyr
 165 170 175

Phe Ile Gly Arg Ile Ile Ser Gly Leu Gly Val Gly Gly Ile Ala Val
 180 185 190

Leu Cys Pro Met Leu Ile Ser Glu Ile Ala Pro Lys His Leu Arg Gly
 195 200 205

Thr Leu Val Ser Cys Tyr Gln Leu Met Ile Thr Ala Gly Ile Phe Leu
 210 215 220

Gly Tyr Cys Thr Asn Tyr Gly Thr Lys Ser Tyr Ser Asn Ser Val Gln
 225 230 235 240

Trp Arg Val Pro Leu Gly Leu Cys Phe Ala Trp Ser Leu Phe Met Ile
 245 250 255

Gly Ala Leu Thr Leu Val Pro Glu Ser Pro Arg Tyr Leu Cys Glu Val
 260 265 270

Asn Lys Val Glu Asp Ala Lys Leu Ser Ile Ala Lys Ser Asn Lys Val
 275 280 285

Ser Pro Glu Asp Pro Ala Val Gln Ala Glu Leu Asp Leu Ile Met Ala
 290 295 300

Gly Ile Glu Ala Glu Lys Leu Ala Gly Asn Ala Ser Trp Gly Glu Leu
 305 310 315 320

Phe Ser Thr Lys Thr Lys Val Phe Gln Arg Leu Leu Met Gly Val Phe
 325 330 335

Val Gln Met Phe Gln Gln Leu Thr Gly Asn Asn Tyr Phe Phe Tyr Tyr
 340 345 350

Gly Thr Val Ile Phe Lys Ser Val Gly Leu Asp Asp Ser Phe Glu Thr
 355 360 365

Ser Ile Val Ile Gly Val Val Asn Phe Ala Ser Thr Phe Phe Ser Leu
 370 375 380

ES 2 629 252 T3

Trp Thr Val Glu Asn Leu Gly Arg Arg Lys Cys Leu Leu Leu Gly Ala
385 390 395 400

Ala Thr Met Met Ala Cys Met Val Ile Tyr Ala Ser Val Gly Val Thr
405 410 415

Arg Leu Tyr Pro His Gly Lys Ser Gln Pro Ser Ser Lys Gly Ala Gly
420 425 430

Asn Cys Met Ile Val Phe Thr Cys Phe Tyr Ile Phe Cys Tyr Ala Thr
435 440 445

Thr Trp Ala Pro Val Ala Trp Val Ile Thr Ala Glu Ser Phe Pro Leu
450 455 460

Arg Val Lys Ser Lys Cys Met Ala Leu Ala Ser Ala Ser Asn Trp Val
465 470 475 480

Trp Gly Phe Leu Ile Ala Phe Phe Thr Pro Phe Ile Thr Ser Ala Ile
485 490 495

Asn Phe Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Met Gly Cys Leu Val Ala Met Phe
500 505 510

Phe Tyr Val Phe Phe Phe Val Pro Glu Thr Lys Gly Leu Ser Leu Glu
515 520 525

Glu Ile Gln Glu Leu Trp Glu Glu Gly Val Leu Pro Trp Lys Ser Glu
530 535 540

Gly Trp Ile Pro Ser Ser Arg Arg Gly Asn Asn Tyr Asp Leu Glu Asp
545 550 555 560

Leu Gln His Asp Asp Lys Pro Trp Tyr Lys Ala Met Leu Glu
565 570

<210> 57

< 211> 574

< 212> PRT

5 < 213> *Saccharomyces cerevisiae* IMW017

<400> 57

Met Ala Val Glu Glu Asn Asn Met Pro Val Val Ser Gln Gln Pro Gln
1 5 10 15

Ala Gly Glu Asp Val Ile Ser Ser Leu Ser Lys Asp Ser His Leu Ser
20 25 30

ES 2 629 252 T3

Ala Gln Ser Gln Lys Tyr Ser Asn Asp Glu Leu Lys Ala Gly Glu Ser
 35 40 45

Gly Pro Glu Gly Ser Gln Ser Val Pro Ile Glu Ile Pro Lys Lys Pro
 50 55 60

Met Ser Glu Tyr Val Thr Val Ser Leu Leu Cys Leu Cys Val Ala Phe
 65 70 75 80

Gly Gly Phe Met Phe Gly Trp Asp Thr Gly Thr Ile Ser Gly Phe Val
 85 90 95

Val Gln Thr Asp Phe Leu Arg Arg Phe Gly Met Lys His Lys Asp Gly
 100 105 110

Thr His Tyr Leu Ser Asn Val Arg Thr Gly Leu Ile Val Ala Ile Phe
 115 120 125

Asn Ile Gly Cys Ala Phe Gly Gly Ile Ile Leu Ser Lys Gly Gly Asp
 130 135 140

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Gly Leu Ser Ile Val Val Ser Val Tyr Ile
 145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ile Gln Ile Ala Ser Ile Asn Lys Trp Tyr Gln Tyr
 165 170 175

Phe Ile Gly Arg Ile Ile Ser Gly Leu Gly Val Gly Gly Ile Ala Val
 180 185 190

Leu Cys Pro Met Leu Ile Ser Glu Ile Ala Pro Lys His Leu Arg Gly
 195 200 205

Thr Leu Val Ser Cys Tyr Gln Leu Met Ile Asn Ala Gly Ile Phe Leu
 210 215 220

Gly Tyr Cys Thr Asn Tyr Gly Thr Lys Ser Tyr Ser Asn Ser Val Gln
 225 230 235 240

Trp Arg Val Pro Leu Gly Leu Cys Phe Ala Trp Ser Leu Phe Met Ile
 245 250 255

Gly Ala Leu Thr Leu Val Pro Glu Ser Pro Arg Tyr Leu Cys Glu Val
 260 265 270

Asn Lys Val Glu Asp Ala Lys Leu Ser Ile Ala Lys Ser Asn Lys Val
 275 280 285

ES 2 629 252 T3

Ser Pro Glu Asp Pro Ala Val Gln Ala Glu Leu Asp Leu Ile Met Ala
 290 295 300

Gly Ile Glu Ala Glu Lys Leu Ala Gly Asn Ala Ser Trp Gly Glu Leu
 305 310 315 320

Phe Ser Thr Lys Thr Lys Val Phe Gln Arg Leu Leu Met Gly Val Phe
 325 330 335

Val Gln Met Phe Gln Gln Leu Thr Gly Asn Asn Tyr Phe Phe Tyr Tyr
 340 345 350

Gly Thr Val Ile Phe Lys Ser Val Gly Leu Asp Asp Ser Phe Glu Thr
 355 360 365

Ser Ile Val Ile Gly Val Val Asn Phe Ala Ser Thr Phe Phe Ser Leu
 370 375 380

Trp Thr Val Glu Asn Leu Gly Arg Arg Lys Cys Leu Leu Leu Gly Ala
 385 390 395 400

Ala Thr Met Met Ala Cys Met Val Ile Tyr Ala Ser Val Gly Val Thr
 405 410 415

Arg Leu Tyr Pro His Gly Lys Ser Gln Pro Ser Ser Lys Gly Ala Gly
 420 425 430

Asn Cys Met Ile Val Phe Thr Cys Phe Tyr Ile Phe Cys Tyr Ala Thr
 435 440 445

Thr Trp Ala Pro Val Ala Trp Val Ile Thr Ala Glu Ser Phe Pro Leu
 450 455 460

Arg Val Lys Ser Lys Cys Met Ala Leu Ala Ser Ala Ser Asn Trp Val
 465 470 475 480

Trp Gly Phe Leu Ile Ala Phe Phe Thr Pro Phe Ile Thr Ser Ala Ile
 485 490 495

Asn Phe Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Met Gly Cys Leu Val Ala Met Phe
 500 505 510

Phe Tyr Val Phe Phe Phe Val Pro Glu Thr Lys Gly Leu Ser Leu Glu
 515 520 525

Glu Ile Gln Glu Leu Trp Glu Glu Gly Val Leu Pro Trp Lys Ser Glu

ES 2 629 252 T3

530

535

540

Gly Trp Ile Pro Ser Ser Arg Arg Gly Asn Asn Tyr Asp Leu Glu Asp
545 550 555 560

Leu Gln His Asp Asp Lys Pro Trp Tyr Lys Ala Met Leu Glu
565 570

<210> 58

< 211> 574

< 212> PRT

5 < 213> *Saccharomyces cerevisiae* IMW018

<400> 58

Met Ala Val Glu Glu Asn Asn Met Pro Val Val Ser Gln Gln Pro Gln
1 5 10 15

Ala Gly Glu Asp Val Ile Ser Ser Leu Ser Lys Asp Ser His Leu Ser
20 25 30

Ala Gln Ser Gln Lys Tyr Ser Asn Asp Glu Leu Lys Ala Gly Glu Ser
35 40 45

Gly Pro Glu Gly Ser Gln Ser Val Pro Ile Glu Ile Pro Lys Lys Pro
50 55 60

Met Ser Glu Tyr Val Thr Val Ser Leu Leu Cys Leu Cys Val Ala Phe
65 70 75 80

Gly Gly Phe Met Phe Gly Trp Asp Thr Gly Thr Ile Ser Gly Phe Val
85 90 95

Val Gln Thr Asp Phe Leu Arg Arg Phe Gly Met Lys His Lys Asp Gly
100 105 110

Thr His Tyr Leu Ser Asn Val Arg Thr Gly Leu Ile Val Ala Ile Phe
115 120 125

Asn Ile Gly Cys Ala Phe Gly Gly Ile Ile Leu Ser Lys Gly Gly Asp
130 135 140

Met Tyr Gly Arg Lys Lys Gly Leu Ser Ile Val Val Ser Val Tyr Ile
145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ile Gln Ile Ala Ser Ile Asn Lys Trp Tyr Gln Tyr
165 170 175

Phe Ile Gly Arg Ile Ile Ser Gly Leu Gly Val Gly Gly Ile Ala Val

ES 2 629 252 T3

Asn Cys Met Ile Val Phe Thr Cys Phe Tyr Ile Phe Cys Tyr Ala Thr
 435 440 445

Thr Trp Ala Pro Val Ala Trp Val Ile Thr Ala Glu Ser Phe Pro Leu
 450 455 460

Arg Val Lys Ser Lys Cys Met Ala Leu Ala Ser Ala Ser Asn Trp Val
 465 470 475 480

Trp Gly Phe Leu Ile Ala Phe Phe Thr Pro Phe Ile Thr Ser Ala Ile
 485 490 495

Asn Phe Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Met Gly Cys Leu Val Ala Met Phe
 500 505 510

Phe Tyr Val Phe Phe Phe Val Pro Glu Thr Lys Gly Leu Ser Leu Glu
 515 520 525

Glu Ile Gln Glu Leu Trp Glu Glu Gly Val Leu Pro Trp Lys Ser Glu
 530 535 540

Gly Trp Ile Pro Ser Ser Arg Arg Gly Asn Asn Tyr Asp Leu Glu Asp
 545 550 555 560

Leu Gln His Asp Asp Lys Pro Trp Tyr Lys Ala Met Leu Glu
 565 570

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación de una célula de levadura que fermenta pentosa y glucosa, en el que una célula de levadura que es una célula de *Saccharomyces* que comprende uno más genes exógenos de la ruta metabólica de la pentosa se somete a a) perturbación de cada uno de los genes *hvk2*, *hvk1* y *glk1* y *gal1* naturales en la célula de levadura, en donde b) el perturbador resultante se somete a manipulación evolutiva para mejorar el consumo de pentosa, hasta que la célula de levadura tiene una velocidad de crecimiento de $0,05 \text{ h}^{-1}$ o más sobre la pentosa como única fuente de carbono y aislar la célula de levadura fermentadora de pentosa resultante, y en el que
- 10 c) en la levadura resultante se introduce uno o más de los genes *hvk1*, *hvk2*, *glk1* y *gal1*, a fin de restaurar su capacidad para consumir glucosa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cepa perturbadora es una célula de levadura que comprende uno o más genes exógenos de una o más rutas metabólicas de la pentosa no naturales para la célula de levadura.

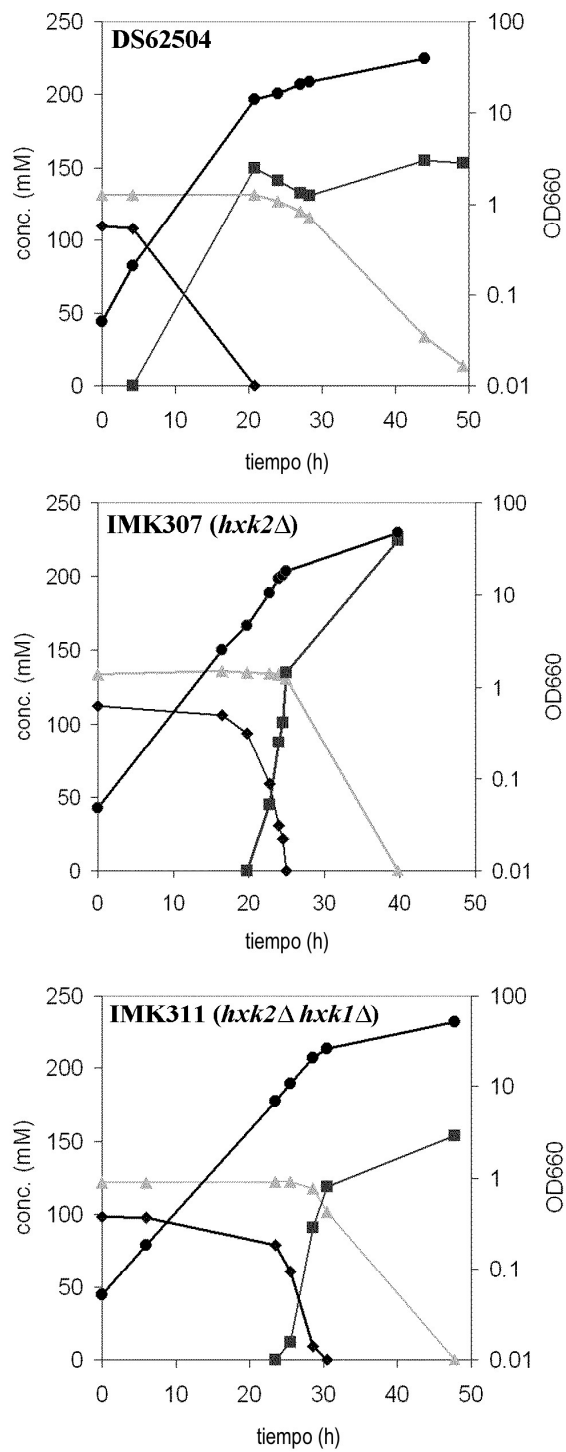


Fig. 1

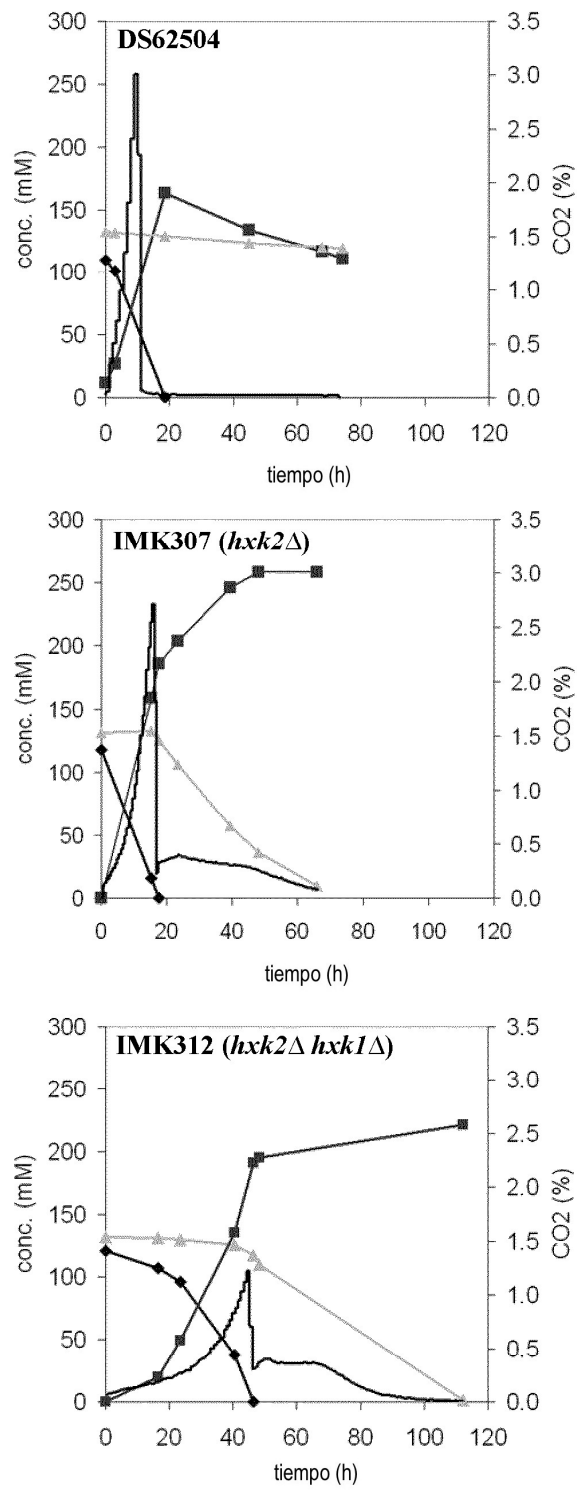


Fig. 2

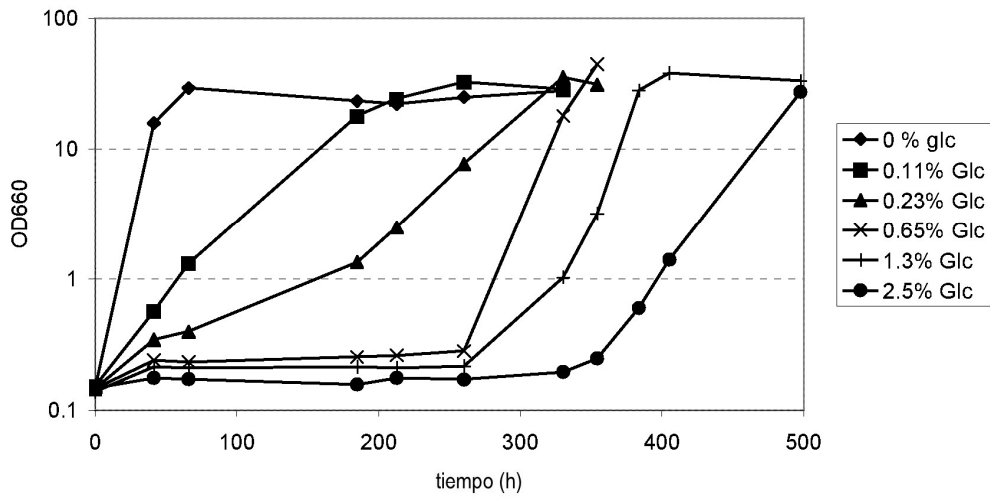


Fig. 3

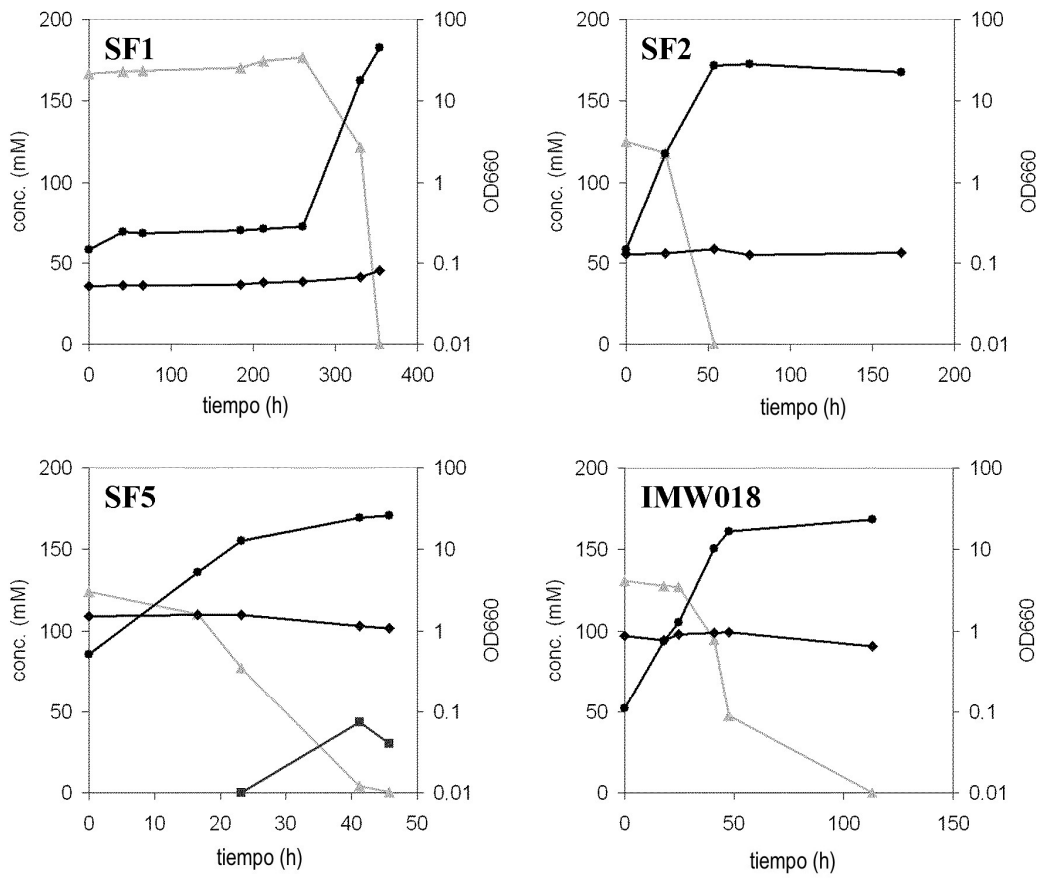


Fig. 4

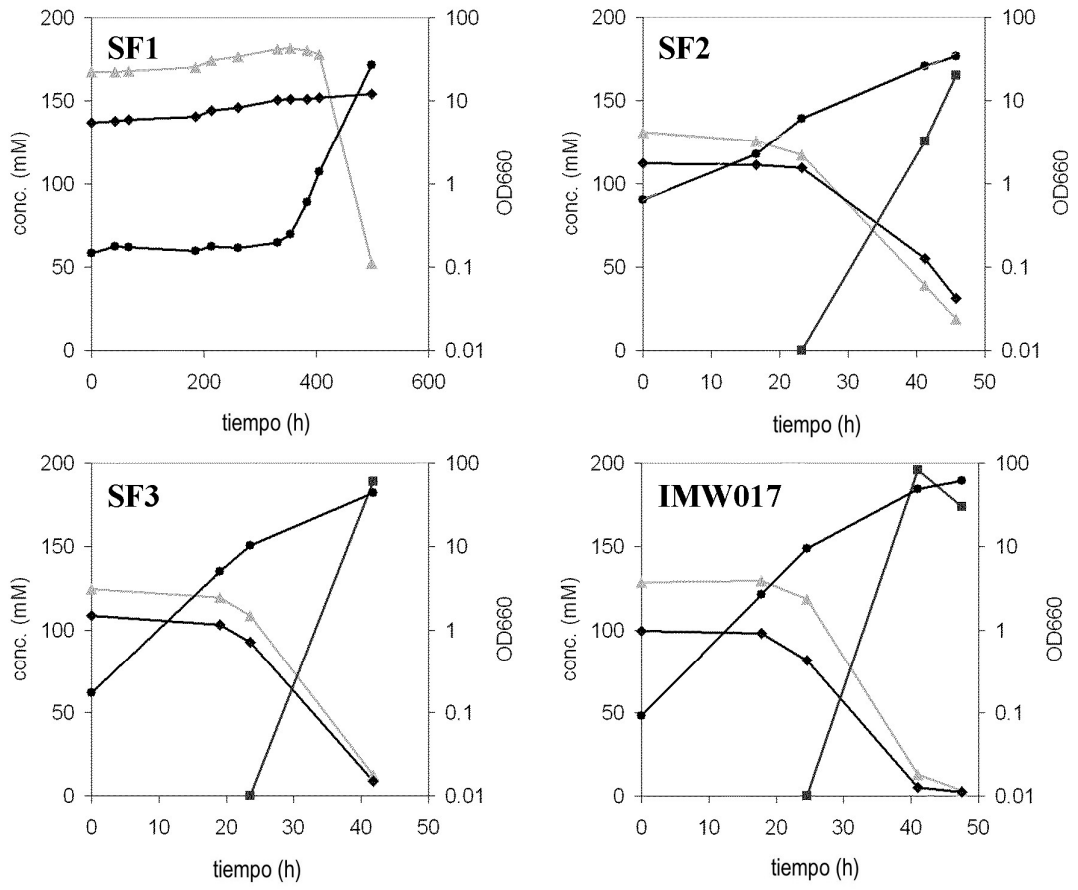


Fig. 5

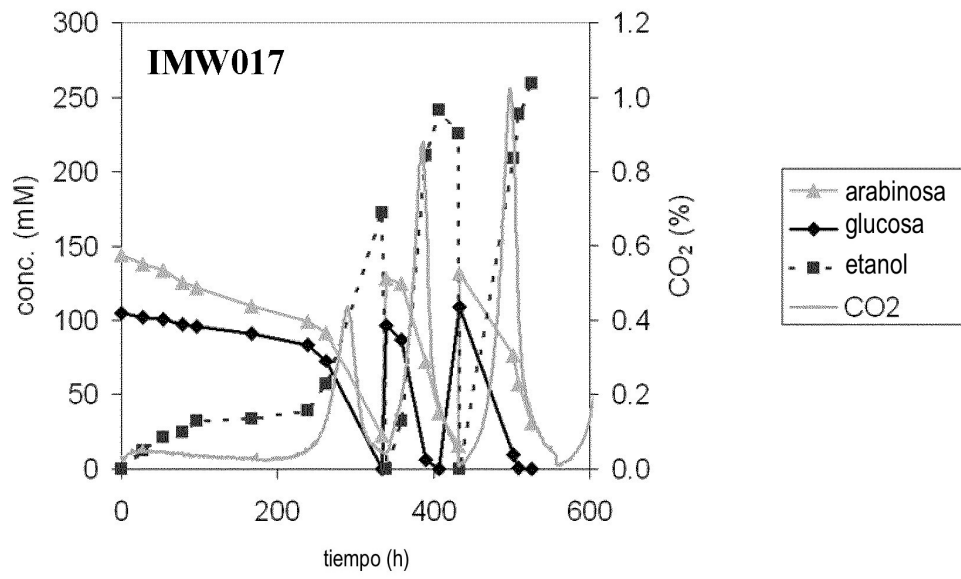


Fig. 6

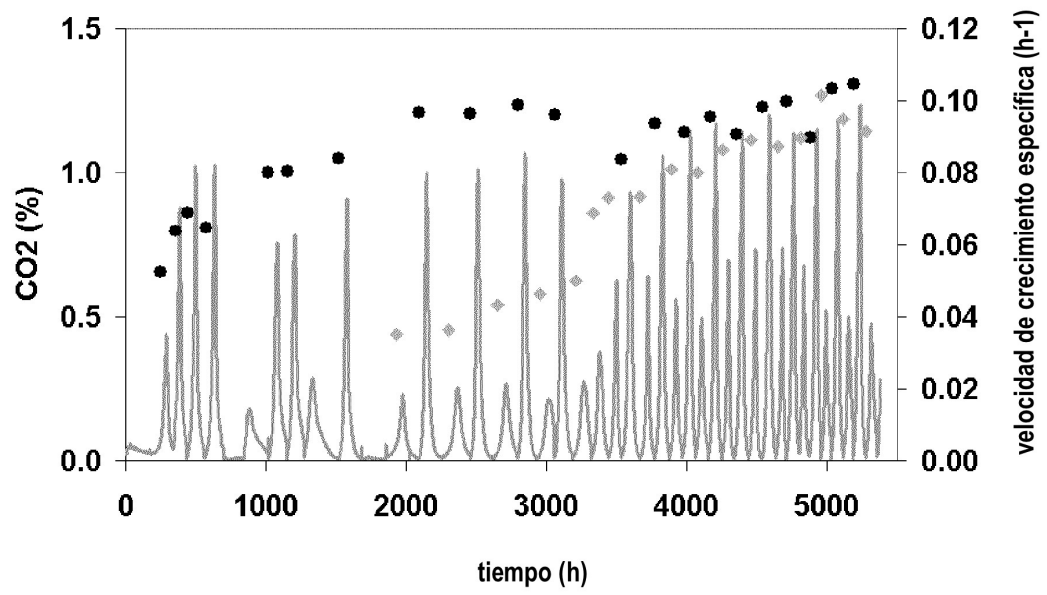


Fig. 7

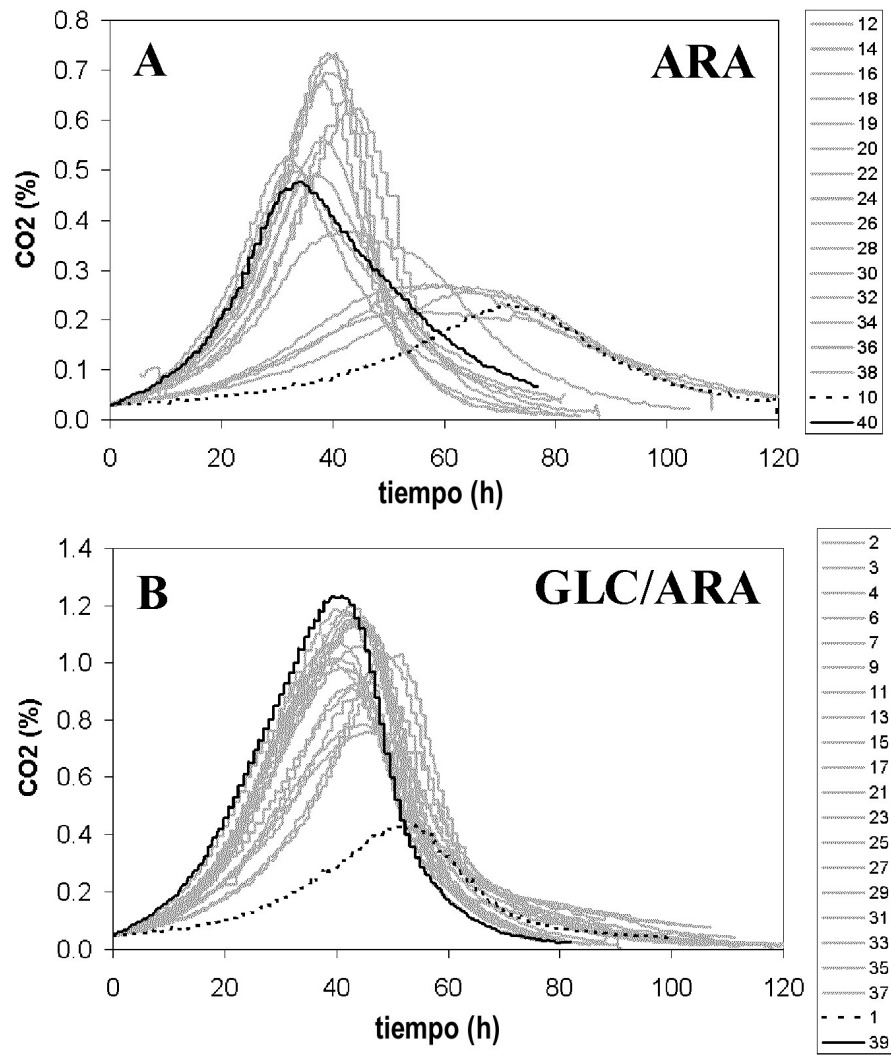


Fig. 8

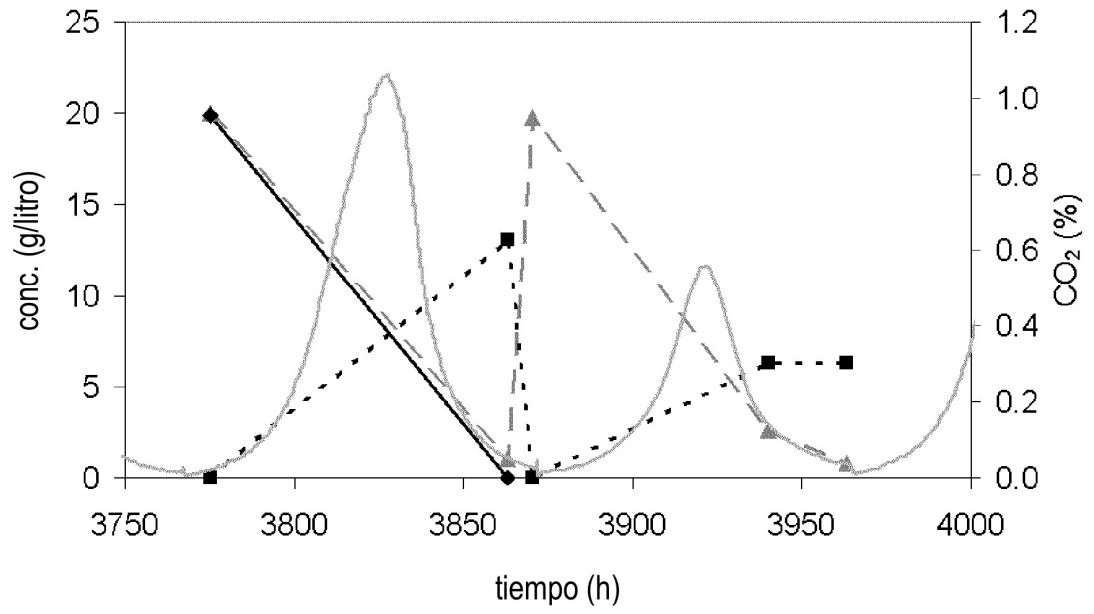


Fig.9

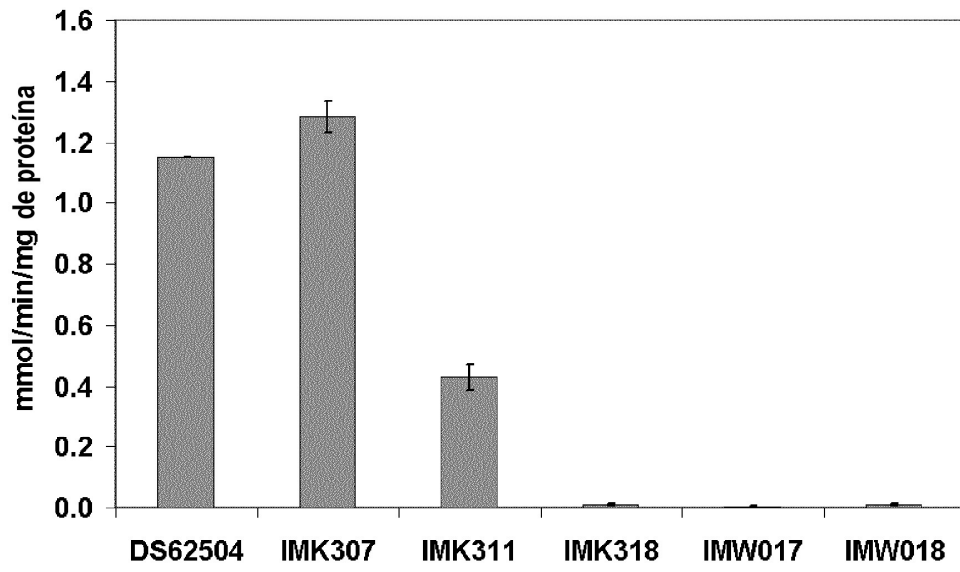


Fig. 10

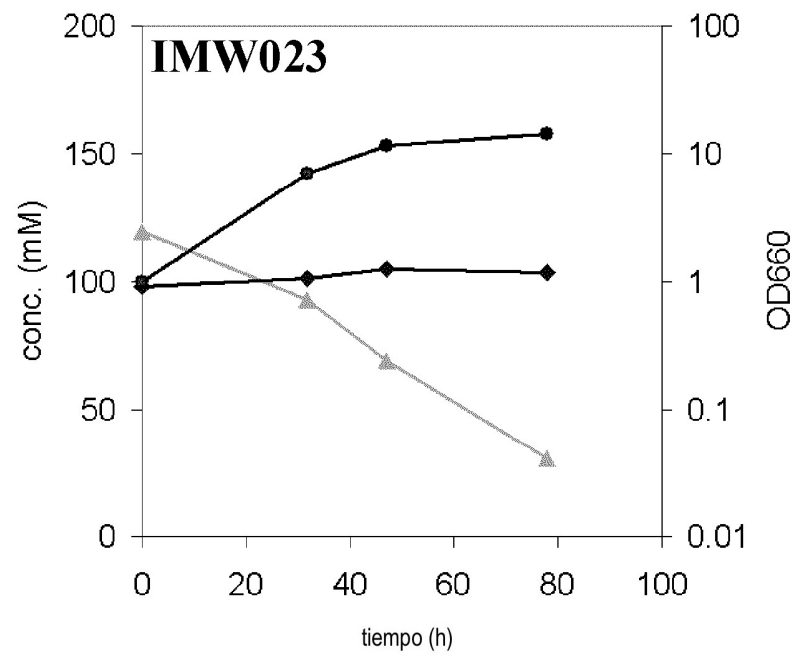


Fig. 11

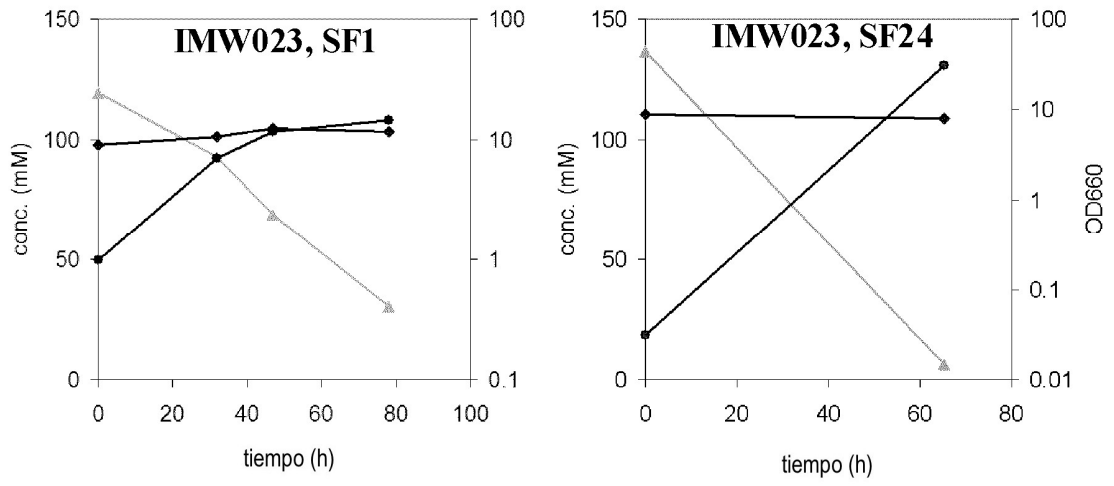


Fig 12

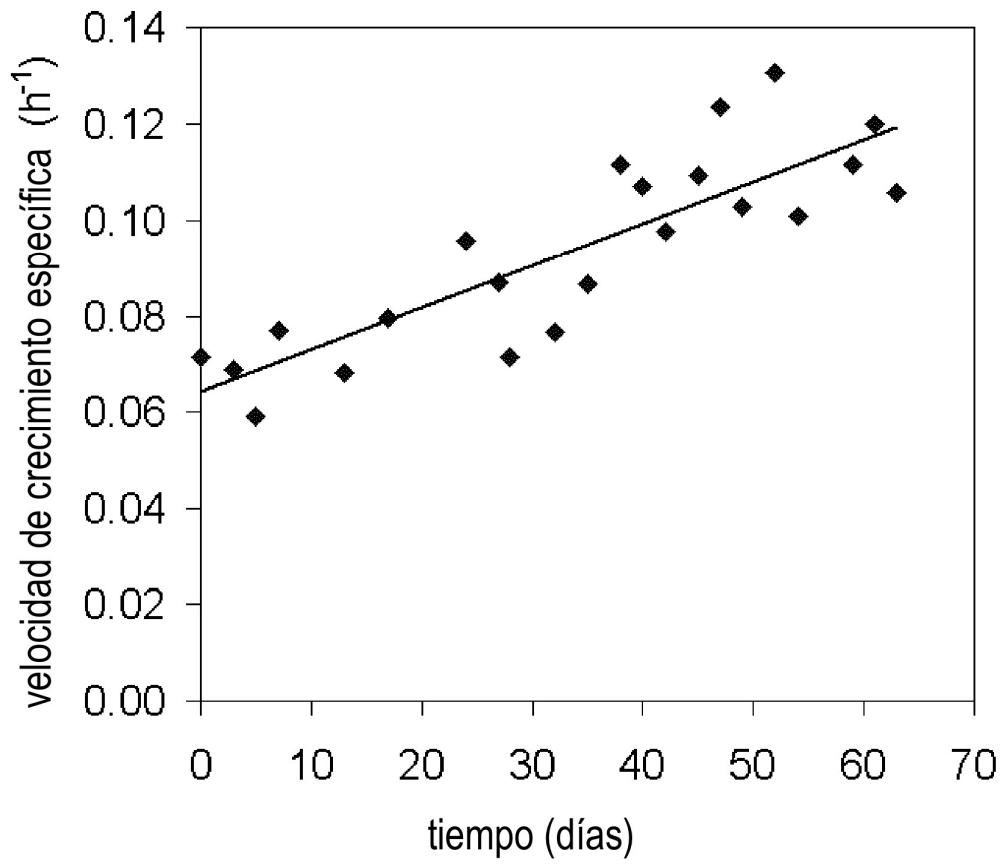


Fig. 13

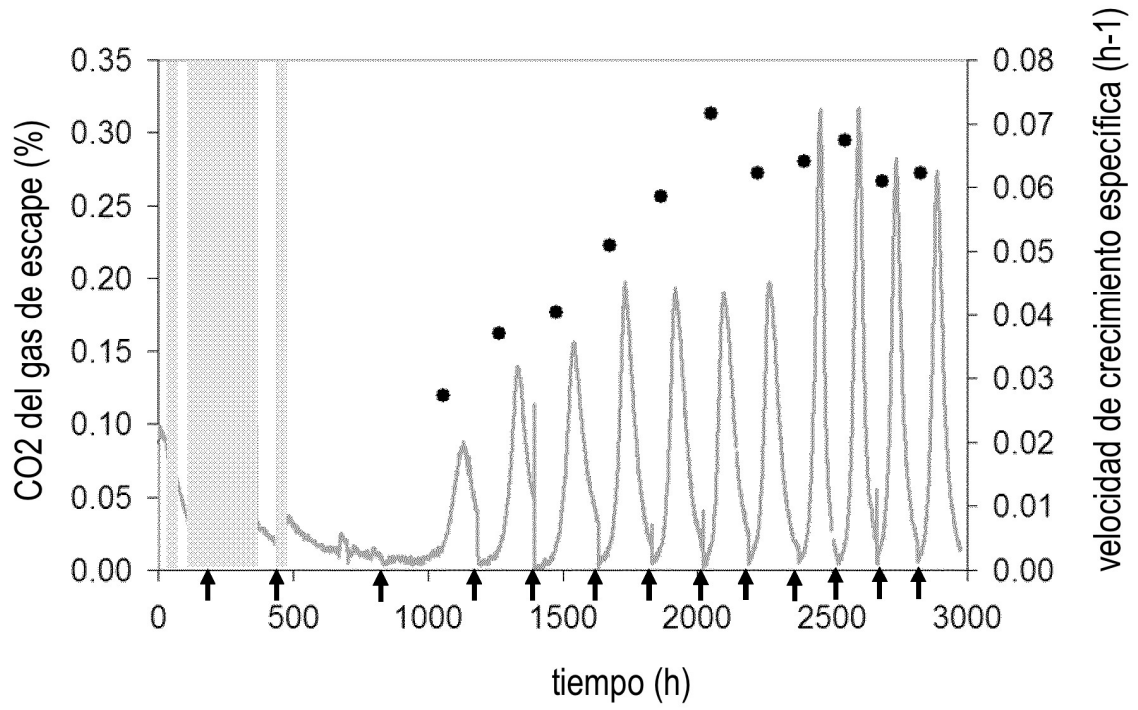


Fig. 14

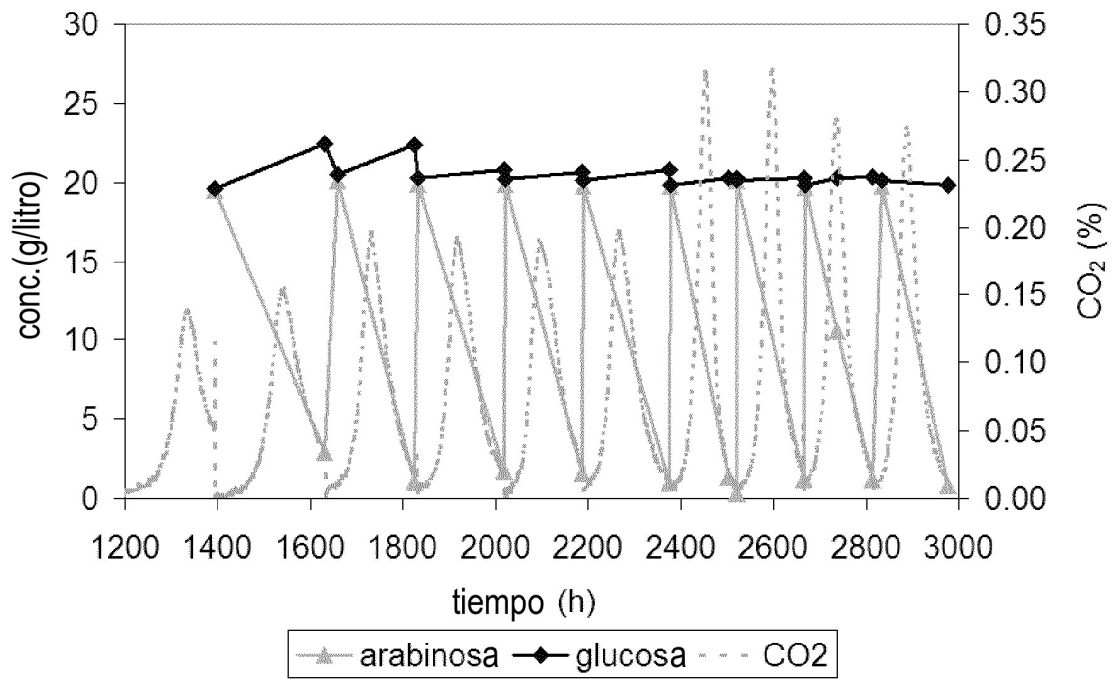


Fig. 15

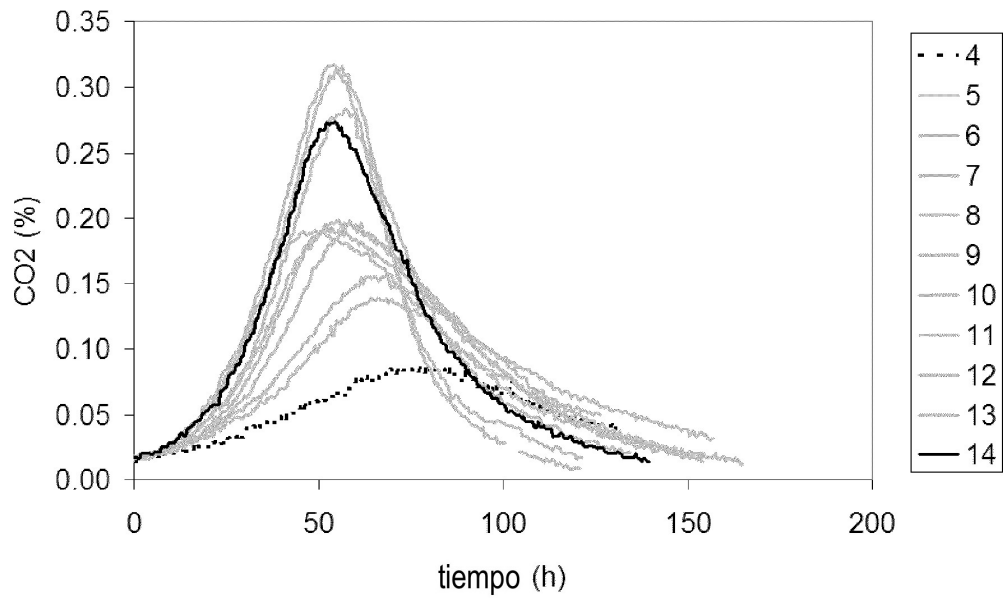


Fig. 16

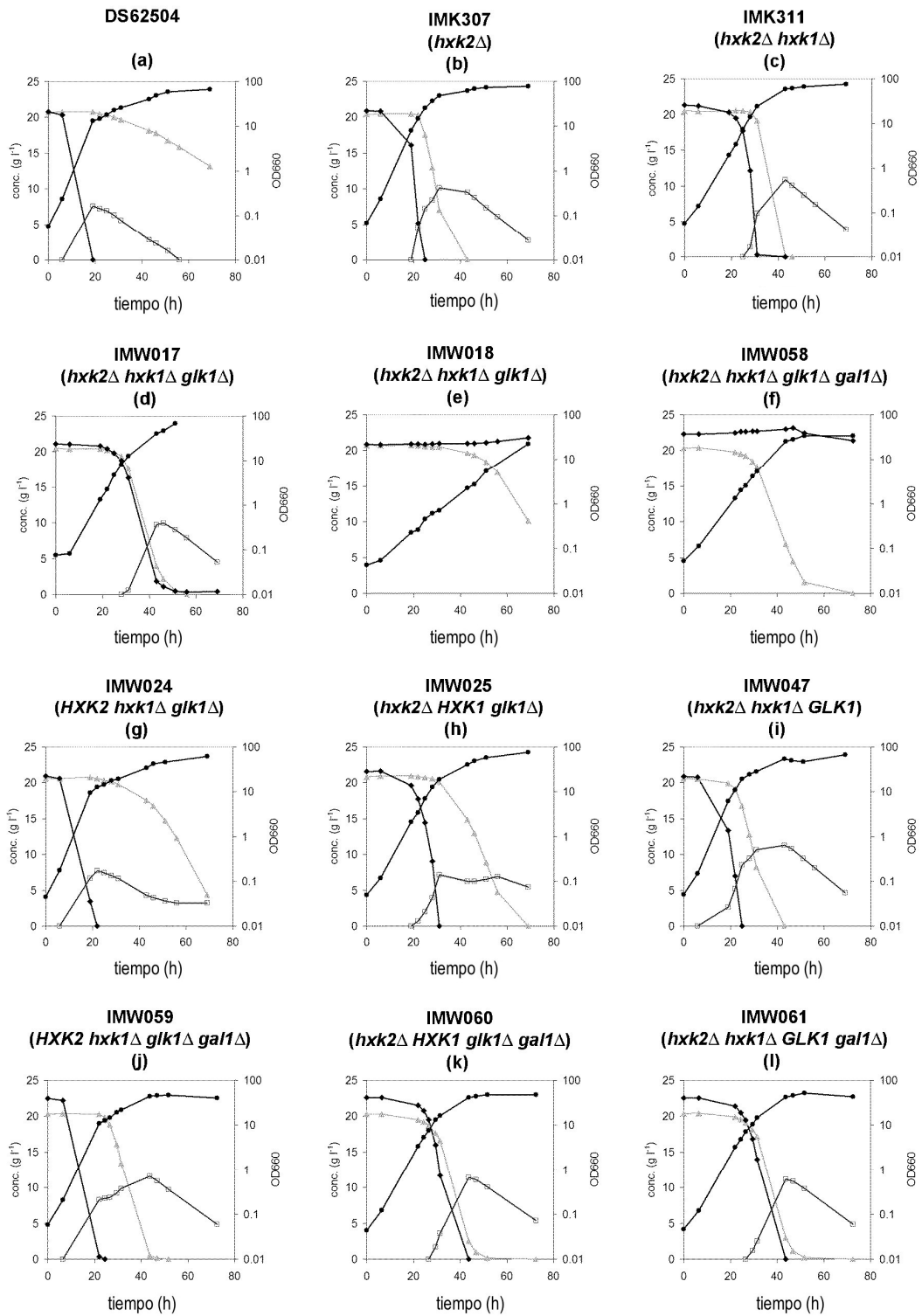


Fig. 17

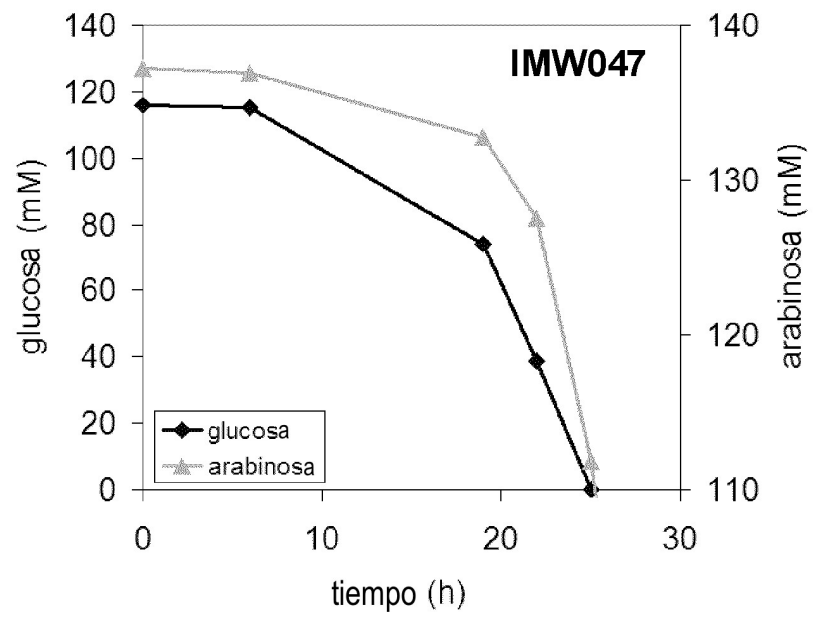


Fig. 18

ES 2 629 252 T3

GAL1 CEN.PK	1	mtkshseevivpefnssakelprplaekcpsiiikkfisaydakpdfvarsppgrvnligeh
GAL1 IMK318	1
GAL1 IMW017	1
GAL1 IMW018	1
GAL1 CEN.PK	61	idydcfsvlplaidfdmlcavkvlneknsitlinadpkfaqrkfdlpldgsvyvtidpsv
GAL1 IMK318	61
GAL1 IMW017	61
GAL1 IMW018	61
GAL1 CEN.PK	121	sdwsnyfkcglhvahsflkkklaperfasaplaglqvfcgdvptgslsssaaficaval
GAL1 IMK318	121
GAL1 IMW017	121
GAL1 IMW018	121
GAL1 CEN.PK	181	avvkanmppyghmskqnlmritvvaehyvgvnnngmdqaasvcgeedhalyvefkipqlka
GAL1 IMK318	181
GAL1 IMW017	181
GAL1 IMW018	181
GAL1 CEN.PK	241	tpfkfpqlknhesfviantlvvsnkfetaptnynlrvevttaanvlaatygvvlpsgk
GAL1 IMK318	241
GAL1 IMW017	241
GAL1 IMW018	241
GAL1 CEN.PK	301	egsstnkgnlrdfmnyyaryhnistpwngdiesgierltkmlvlveeslankkqgfsvd
GAL1 IMK318	301
GAL1 IMW017	301
GAL1 IMW018	301
GAL1 CEN.PK	361	dvaqslncsreeftrdylttspvrfqvlklyqrakhvyseslrvlkavklmttesftade
GAL1 IMK318	361v.....
GAL1 IMW017	361v.....
GAL1 IMW018	361v.....
GAL1 CEN.PK	421	dffkqfgalmnesqascdklyecsceidkicsialsnsgsygsrltgagwggtvhlvpg
GAL1 IMK318	421
GAL1 IMW017	421
GAL1 IMW018	421
GAL1 CEN.PK	481	gpngniekvkealanefykvypkitdaelenalivskpalgsclyel
GAL1 IMK318	481
GAL1 IMW017	481
GAL1 IMW018	481

Fig.19

ES 2 629 252 T3

```

GAL2 CENFK AA      1 maveennmpvvsqqpqagedvisslskdshlsaqsqkysndelkagesgpegqsqsvpiei
GAL2 IMK318 AA    1 .....
GAL2 IMW017 AA    1 .....
GAL2 IMW018 AA    1 .....

GAL2 CENFK AA     61 pkkpmseyvtvs1lclcvafggfmfgwdtgtisgfvvqtdflrrfgmkhkdgthylsnvr
GAL2 IMK318 AA    61 .....
GAL2 IMW017 AA    61 .....
GAL2 IMW018 AA    61 .....

GAL2 CENFK AA    121 tglivai fnigcaf ggiils kggdmygrkkglsvsvyivgiii qiasinkwyqyfigr
GAL2 IMK318 AA   121 .....
GAL2 IMW017 AA   121 .....
GAL2 IMW018 AA   121 .....

GAL2 CENFK AA    181 iisglgv ggiavlcpmliseiapkhlrgtlvscyqlmitagiflgyctnygtksysnsqv
GAL2 IMK318 AA   181 .....
GAL2 IMW017 AA   181 .....
GAL2 IMW018 AA   181 .....

GAL2 CENFK AA    241 wrvplglcfawslfmigaltlvpesprylcevnkvedaklsiaksnkvspedpavqaeld
GAL2 IMK318 AA   241 .....
GAL2 IMW017 AA   241 .....
GAL2 IMW018 AA   241 .....

GAL2 CENFK AA    301 limagiaeaklagnaswgelfstktkvfqrllmgvfvmfqqqltgnyffyygtvifksv
GAL2 IMK318 AA   301 .....
GAL2 IMW017 AA   301 .....
GAL2 IMW018 AA   301 .....

GAL2 CENFK AA    361 gldds fetsivigvvnfastffslwtvenlgrrkclllgaatmmacmviyasvgvtrlyp
GAL2 IMK318 AA   361 .....
GAL2 IMW017 AA   361 .....
GAL2 IMW018 AA   361 .....

GAL2 CENFK AA    421 hgksqps skgagncmivftcfyficyattwapvawvitaesfplrvkskcmalasadnwv
GAL2 IMK318 AA   421 .....
GAL2 IMW017 AA   421 .....
GAL2 IMW018 AA   421 .....

GAL2 CENFK AA    481 wgfliafftpfitsainfyygyvfm gclvamffvffvfpetkglsl eeiqelweegvlp
GAL2 IMK318 AA   481 .....
GAL2 IMW017 AA   481 .....
GAL2 IMW018 AA   481 .....

GAL2 CENFK AA    541 wksegwipssrrgnydledlqhddkpwkaml e
GAL2 IMK318 AA   541 .....
GAL2 IMW017 AA   541 .....
GAL2 IMW018 AA   541 .....

```

Fig. 20

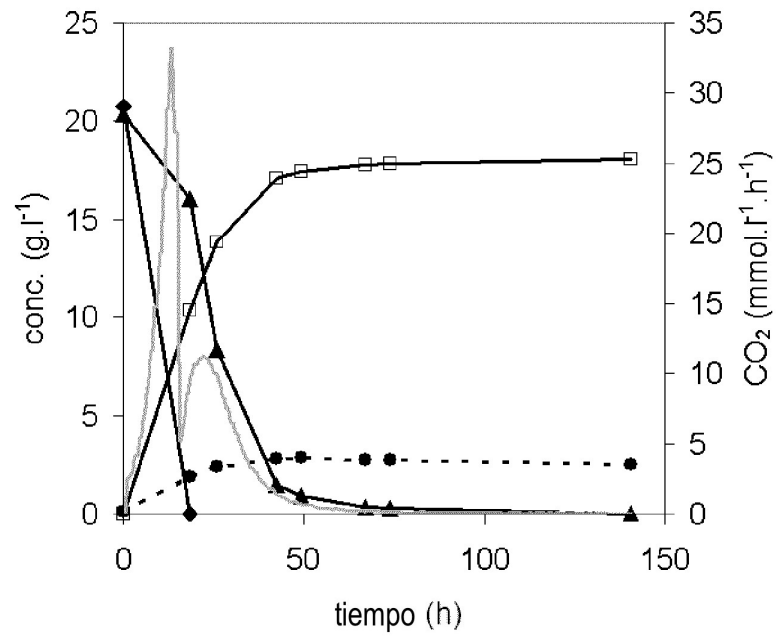


Fig. 21

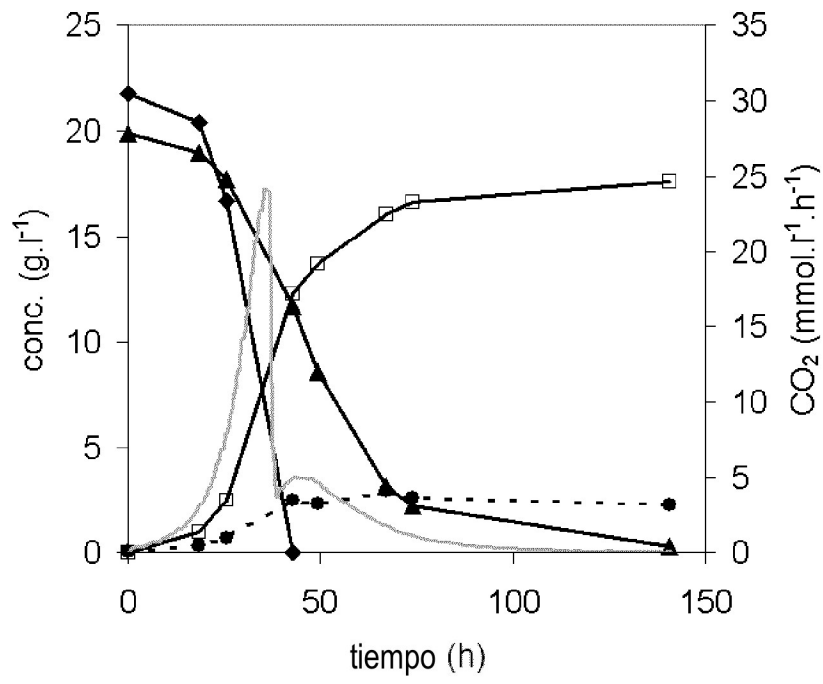


Fig. 22

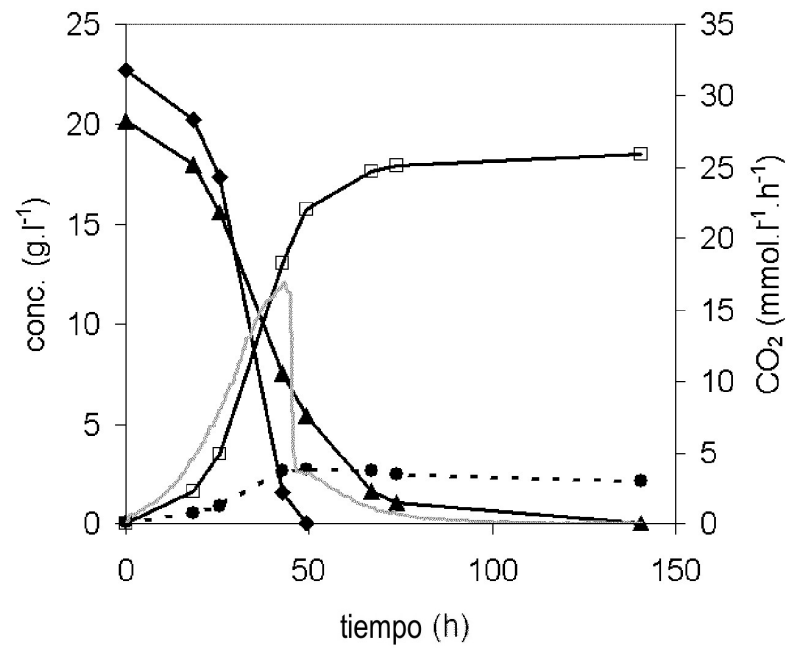


Fig. 23

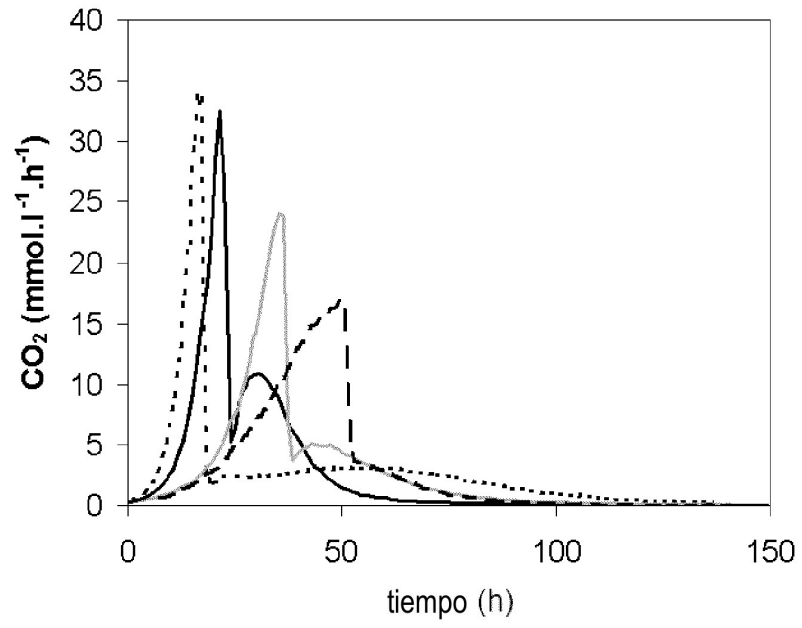


Fig. 24

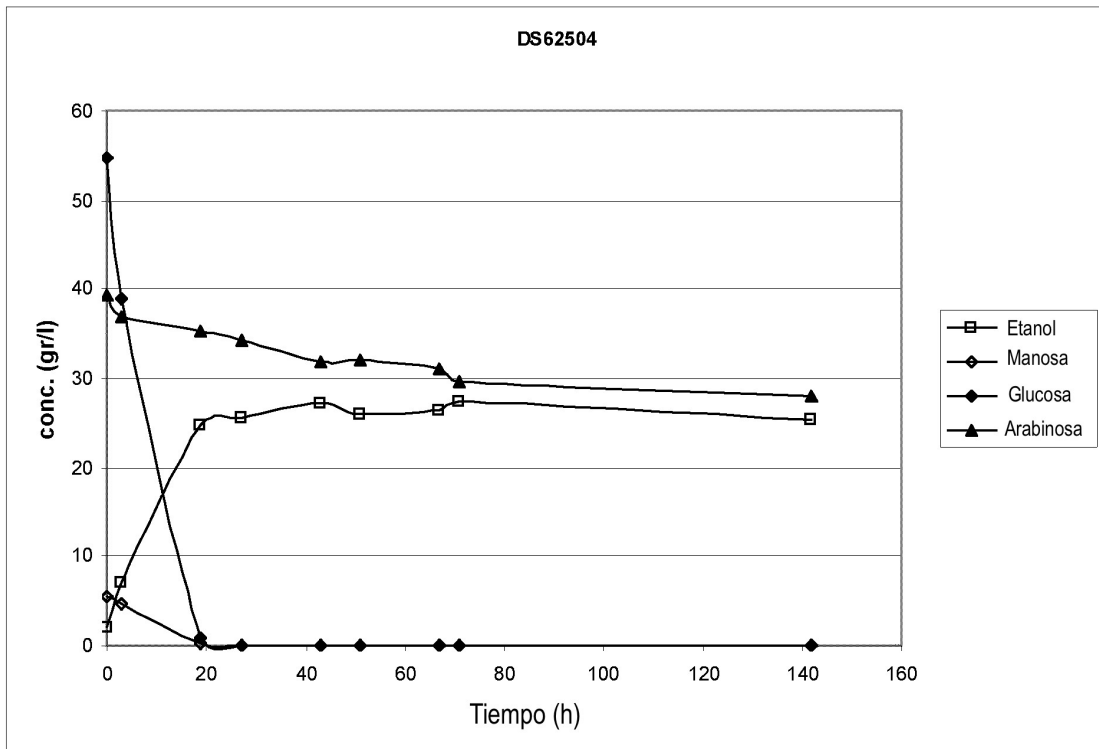


Fig. 25

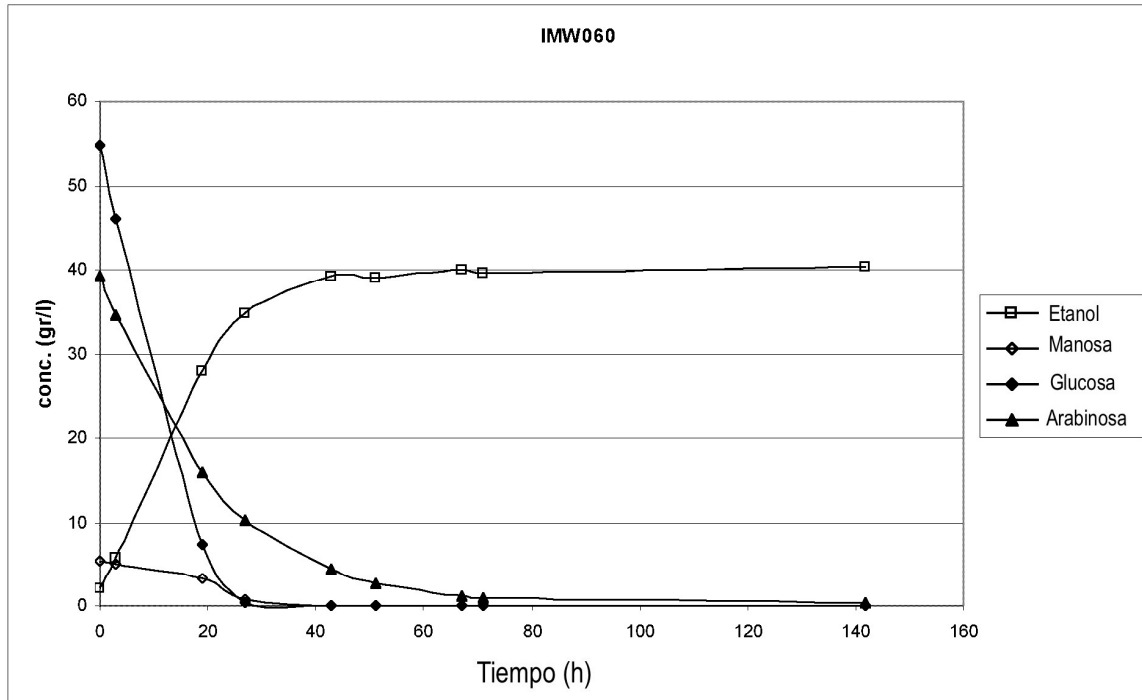


Fig. 26

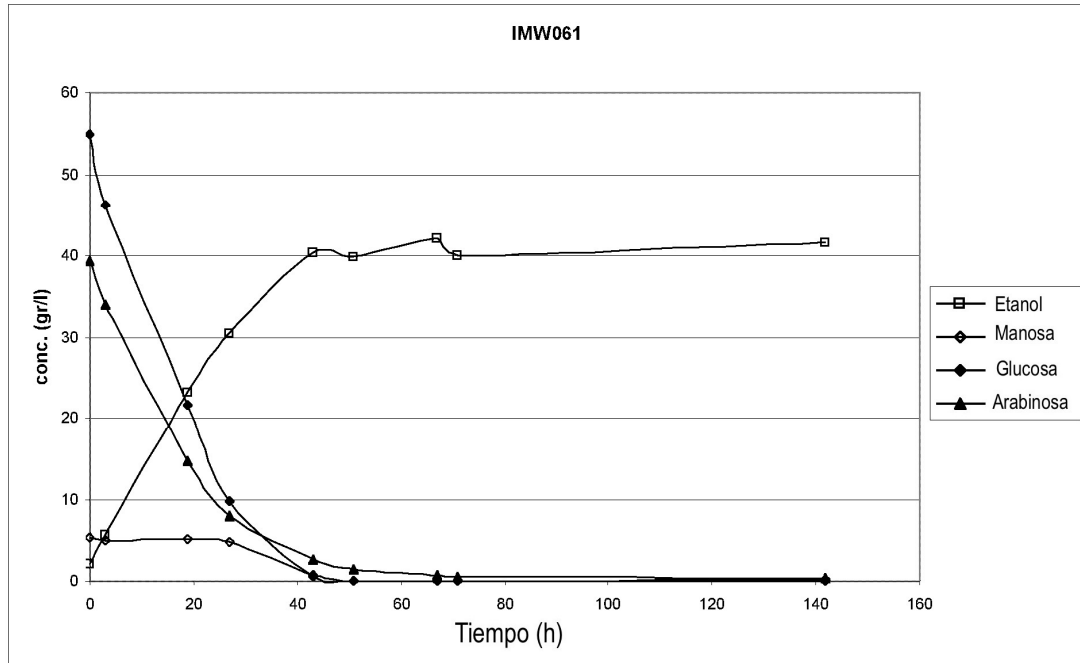


Fig. 27

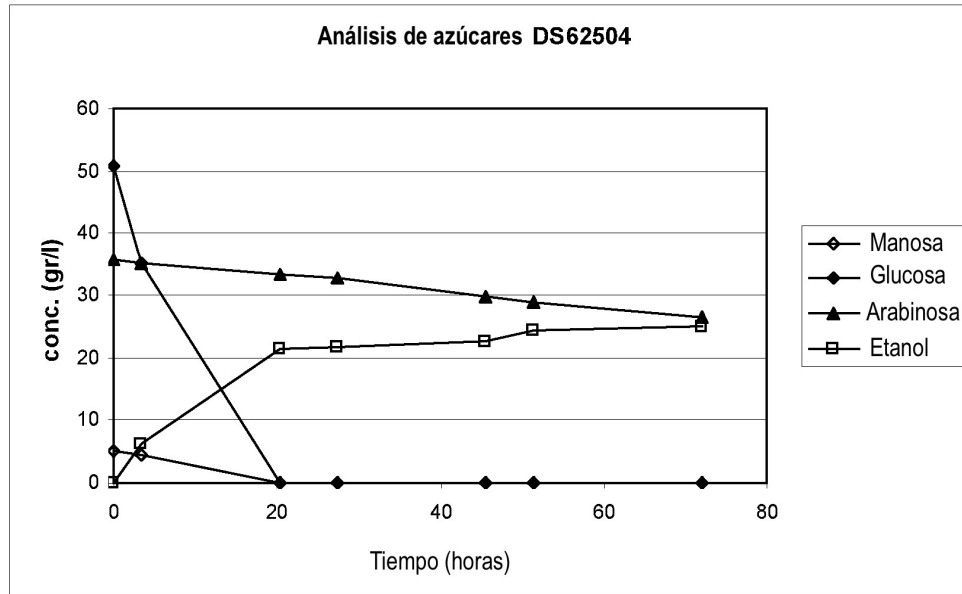


Fig. 28

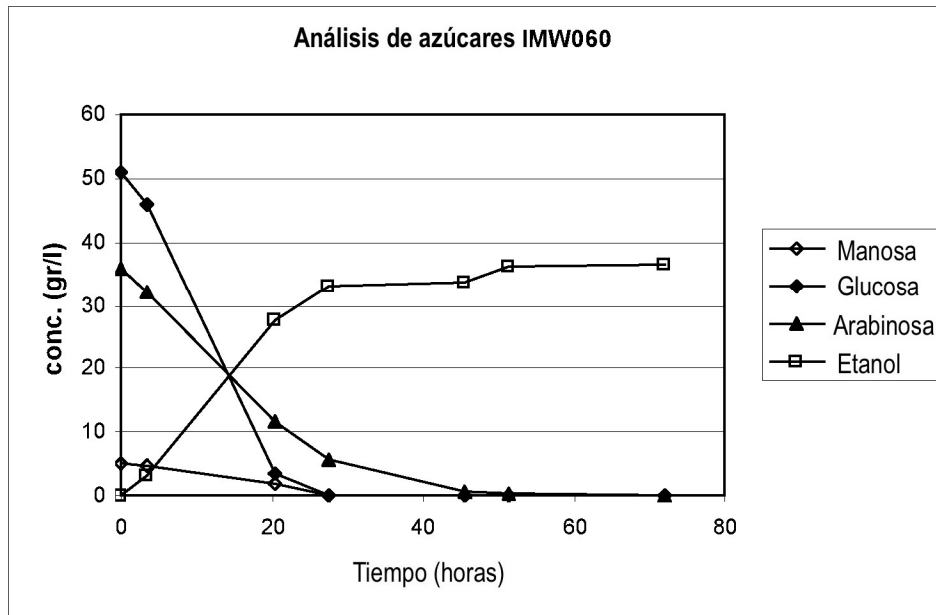


Fig. 29

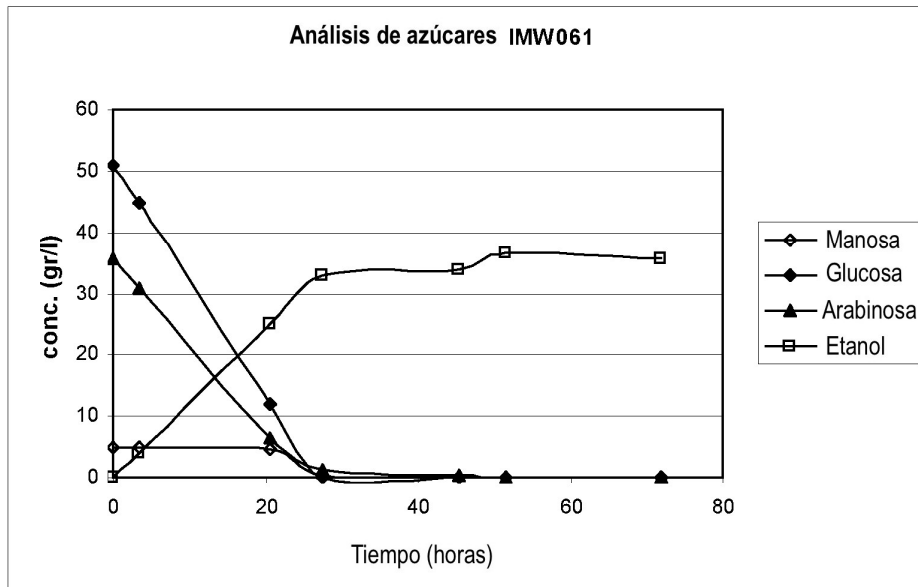


Fig. 30