



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 256 742**

⑤① Int. Cl.:
C12N 1/19 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12R 1/85 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **03725947 .0**
⑧⑥ Fecha de presentación : **07.05.2003**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1499708**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

⑤④ Título: **Una levadura modificada que consume L-arabinosa.**

③⑩ Prioridad: **08.05.2002 SE 2002101428**
04.07.2002 SE 2002102090

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2006

⑦③ Titular/es: **Forskarpatent i Syd AB.**
Teknopol
223 70 Lund, SE

⑦② Inventor/es: **Boles, Eckhard y**
Becker, Jessica

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 256 742 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

Una levadura modificada que consume L-arabinosa.

5 **Área técnica**

La presente invención se refiere a una cepa de levadura modificada, preferiblemente de *Saccharomyces cerevisiae*, que consume L-arabinosa a la vez que produce etanol, así como a un método para producir etanol.

10 **Antecedentes de la invención**

El etanol como combustible se considera como una alternativa adecuada a los combustibles fósiles y puede producirse a partir de biomasa de plantas, que es un recurso de bajo coste y renovable que está disponible en grandes cantidades. Por esta razón la biomasa de celulosa, que incluye restos agrícolas, desechos de papel, troceados de madera, etc., es una fuente de azúcares ideal que está disponible abundantemente para la fermentación a etanol. Por ejemplo, cuando la glucosa se produce a partir de cereales, se generan sub-productos que contienen hemi-celulosa que consisten principalmente en los azúcares pentosa arabinosa y xilosa (arabinoxilano). Éstos se utilizan actualmente como alimento de bajo coste para el ganado. Pero este recurso podría utilizarse de una manera más rentable si se integrara en el procesamiento del almidón existente que rinde etanol y derivados del almidón.

En el contexto de la conversión de azúcares de hemi-celulosa, es importante la fermentabilidad de la L-arabinosa. La aproximación se hace habitualmente teniendo en cuenta que los hidrolizados generados mediante pretratamiento con ácido diluído contienen sólo D-xilosa, debido a que éste es el azúcar de hemi-celulosa más abundante. Como consecuencia de esto, la mayoría de los estudios sobre la conversión de hidrolizados de hemi-celulosa se centran en la conversión de D-xilosa. Sin embargo, la hemi-celulosa al ser un heteropolisacárido contiene pentosanos y hexosanos. Aunque el xilano es el pentosano dominante y el glucomanano es el hexosano dominante, los niveles de arabinano son significativos en algunos materiales de biomasa. En particular, los niveles de arabinano son significativos en especies herbáceas en las que representa hasta el 10 a 20% de los carbohidratos no glucanos totales. Los biocatalizadores microbianos seleccionados para desarrollar o fermentar los hidrolizados obtenidos a partir de materiales con un contenido alto de arabinano deben tener, por lo tanto, la capacidad de fermentar L-arabinosa así como xilosa y preferiblemente también otros azúcares a etanol.

Muchos tipos de levaduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* y las especies relacionadas, se han utilizado tradicionalmente para fermentar materias primas base basadas en glucosa a etanol mediante fermentación anaerobia debido a que son los microorganismos más seguros y eficaces para fermentar azúcares a etanol. Sin embargo, estas levaduras superiores que fermentan glucosa son incapaces de fermentar xilosa y L-arabinosa y también son incapaces de utilizar estos azúcares pentosa para crecer. Otras pocas especies de levaduras tales como *Pichia stipitis* y *Candida shehatae* pueden fermentar xilosa a etanol; sin embargo, no son tan eficaces como *Saccharomyces* en la fermentación de la glucosa y tienen una tolerancia para el etanol relativamente baja. Por lo tanto, no son adecuadas para la producción industrial a gran escala de etanol a partir de biomasa. Algunas levaduras pueden utilizar L-arabinosa para crecer pero ninguna levadura puede fermentarla a cantidades comerciales de etanol. Al contrario que las levaduras y los hongos, la mayoría de las bacterias, incluyendo *E. coli* y *Bacillus subtilis*, pueden utilizar L-arabinosa para el crecimiento aerobio y también son capaces de fermentarla a diferentes productos incluyendo etanol.

Sedlak y HO, Enzyme Microb. Technol. 28, (2001), pp. 16-24 describen una expresión del operón araBAD de *E. coli*, que codifica enzimas para metabolizar la L-arabinosa, en *Saccharomyces cerevisiae*. Gracias a esto, la cepa expresa *araA*, *araB* y *araD*, pero es incapaz de producir etanol.

50 **Compendio de la invención**

Ahora ha sido posible resolver este problema mediante la creación de una cepa nueva de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* capaz de consumir L-arabinosa, y de producir etanol.

55 **Descripción detallada de la presente invención**

Sorprendentemente, se ha visto que es posible solucionar el problema de tener una levadura que consume L-arabinosa mediante la presente invención mediante la obtención de un método para producir una cepa de levadura que utiliza L-arabinosa para la producción de etanol, método que se caracteriza porque se modifica una cepa de levadura mediante la introducción y expresión del gen *araA* (L-arabinosa isomerasa) de *B. subtilis*, gen *araB* (L-ribuloloquinasa) de *E. coli* y gen *araD* (L-ribulosa-5-P 4-epimerasa) de *E. coli*, y que posee mutaciones adicionales en su genoma o sobreexpresa el gen *TALI* (transaldolasa) de *S. cerevisiae*, lo que le permite consumir L-arabinosa y producir etanol.

La invención se describirá más en detalle en lo que sigue mediante referencia a varios experimentos descritos que explican la naturaleza de la invención.

ES 2 256 742 T3

La solicitud también abarca la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* JBY25-4M (DSM 15560) y la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* JBY24-3T (DSM 15559) que se depositaron en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen el 4 de abril, 2003 bajo la Convención de Budapest.

5 En primer lugar, los genes *araA* (L-arabinosa isomerasa), *araB* (L-ribuloquinasa) y *araD* (L-ribulosa-5-P 4-epimerasa) de *E. coli* se clonaron y sobreexpresaron detrás del fragmento del promotor fuerte *HXT7* en vectores multicopia en cepas CEN.PK de *S. cerevisiae*. Mientras *araA* no produjo ninguna actividad L-arabinosa isomerasa en los transformantes de levadura, la sobreexpresión de *araB* produjo hasta 0,7 U/mg de proteína de actividad L-ribuloquinasa y *araD* produjo hasta 0,13 U/mg de proteína de actividad L-ribulosa-5-P 4-epimerasa. La transformación de CEN.PK2-10 1C con las tres construcciones juntas no permitió a los transformantes crecer en medio de L-arabinosa. Se ha visto que la galactosa permeasa de levaduras (*Gal2*) es capaz de transportar L-arabinosa [J. Bacteriol. 103, 671-678 (1970)]. La sobreexpresión simultánea de *GAL2* detrás del promotor *ADHI* junto a los genes bacterianos que metabolizan L-arabinosa tampoco permitió a los transformantes crecer en medio de L-arabinosa.

15 En segundo lugar, la clonación y sobreexpresión del gen *araA* de *Bacillus subtilis* detrás del fragmento de promotor fuerte *HXT7* en vectores multicopia en la cepa CEN.PK2-1C de *S. cerevisiae* resultó en una proteína activa en levaduras, que produjo actividad L-arabinosa isomerasa en el orden de al menos algunas mU/mg de proteína. De manera similar, la sobreexpresión del gen *araA* de *Mycobacterium smegmatis* detrás del fragmento del promotor fuerte *HXT7* en un vector multicopia en la cepa CEN.PK2-1C de *S. cerevisiae* produjo actividad L-arabinosa isomerasa.

20 Después, los transformantes que expresan el gen *araA* de *B. subtilis* junto a los genes *araB* y *araD* de *E. coli* así como el gen *GAL2* de levadura se incubaron durante varias semanas en medios líquidos (sintético completo o sintético completo/0,1% extracto de levadura/0,2% peptona) siendo L-arabinosa la única fuente de carbono. Después de 4 a 25 5 días de incubación, los transformantes comenzaron a crecer lentamente en estos medios, al contrario que una cepa que contiene sólo cuatro vectores vacíos. Cuando las células alcanzaron una DO_{600} de 3 a 4, se inocularon en medio fresco a una DO_{600} de 0,3, y se crecieron adicionalmente. El crecimiento se hizo más rápido después de 10 días. Estas observaciones indican la aparición de mutaciones supresoras espontáneas que permiten a las células utilizar L-arabinosa más eficazmente. Si no, las células podrían adaptarse de alguna manera a la utilización de L-arabinosa.

30 Con el fin de distinguir entre mutaciones supresoras o un proceso de adaptación, los transformantes mutantes se crecieron en medio de glucosa y después se cambiaron de nuevo a medio de arabinosa. Empezaron a crecer en medio de arabinosa únicamente con una fase de latencia corta lo que indica que contienen mutaciones específicas que permiten a las células crecer en arabinosa. Las actividades de las tres enzimas heterólogas se determinaron en extractos crudos de los transformantes originales y mutantes. Mientras que las actividades de L-ribulosa-5-P 4-epimerasa y L-arabi-35 nosa isomerasa fueron similares en ambas cepas, la actividad L-ribuloquinasa se redujo mucho en los transformantes mutantes.

Cuando los transformantes mutantes se seleccionaron tomando como base la pérdida de sus plásmidos no fueron capaces de seguir creciendo en arabinosa. Los plásmidos se re-aislaron y amplificaron en *E. coli*. Los plásmidos re-40 aislados se transformaron en una cepa CEN.PK2-1C de tipo salvaje. Cuando el crecimiento de estos transformantes nuevos en arabinosa se comparó con el de los transformantes mutantes originales, la fase de latencia en medio de arabinosa se prolongó significativamente, lo que indica que se habían producido mutaciones genómicas adicionales en los transformantes mutantes que les permitieron crecer de manera eficaz en arabinosa. Se transformaron diferentes combinaciones de plásmidos originales y re-aislados en la cepa mutante JBY25. Resultó que la sustitución de los 45 plásmidos re-aislados *GAL2*, *araD* y *araA* por los plásmidos originales correspondientes afectó sólo ligeramente la capacidad de crecer en arabinosa. Sin embargo, la sustitución del plásmido re-aislado *araB* (L-ribuloquinasa) por el plásmido original correspondiente resultó en un crecimiento muy reducido en arabinosa.

50 Cuando el gen completo de L-ribuloquinasa re-aislado se secuenció, mostró una mutación que da lugar a un intercambio del aminoácido 121 Asp por una Asn en el dominio azúcar quinasa conservado de la quinasa. La determinación de las cinéticas de la enzima mutante reveló que su valor K_m para L-ribulosa se incrementó y la V_{max} disminuyó.

También se llevaron a cabo experimentos de crecimiento con las quinastas de tipo salvaje y mutante expresadas a 55 partir de plásmidos centroméricos en la cepa JBY25 junto a los plásmidos de isomerasa y epimerasa re-aislados. En el caso de la quinasa mutante, este plásmido centromérico no confirió a los transformantes un buen crecimiento en L-arabinosa. Sin embargo, los transformantes que portaban la quinasa de tipo salvaje en un plásmido centromérico mostraron un crecimiento mejor que los transformados con la quinasa sobreexpresada. Este hecho es otra indicación de que la actividad reducida de la quinasa es importante para un crecimiento mejor en L-arabinosa.

60 Con el fin de determinar si los cuatro plásmidos que portan la L-arabinosa isomerasa de *Bacillus subtilis*, L-ribuloquinasa y L-ribulosa 5-P 4-epimerasa de *E. coli* y *Gal2* galactosa permeasa de levaduras, respectivamente, son necesarios para crecer en L-arabinosa, la cepa mutante se transformó con diferentes combinaciones de plásmidos re-aislados y vacíos (sin ningún gen del metabolismo de L-arabinosa). Los transformantes sin L-arabinosa isomerasa, L-65 ribuloquinasa o L-ribulosa 5-P 4-epimerasa pero transformados con los otros tres plásmidos re-aislados no mostraron ningún crecimiento en L-arabinosa lo que indica que estos genes son absolutamente necesarios para la utilización de L-arabinosa. Los transformantes sin la galactosa permeasa sobreexpresada son capaces de crecer en medio de L-arabinosa, pero con velocidades de crecimiento ligeramente disminuidas respecto a la cepa mutante que contiene

ES 2 256 742 T3

los cuatro plásmidos re-aislados, lo que indica que la sobreexpresión de un transportador no es necesaria para el crecimiento en L-arabinosa pero puede mejorarlo.

5 Con el fin de ensayar si sólo una o más mutaciones en el genoma de la cepa CEN-PK2-1C de tipo salvaje permiten a los transformantes crecer en L-arabinosa, y si esta(s) mutacione(s) son recesivas o dominantes, se cruzaron la cepa mutante y también la cepa de tipo salvaje, cada una transformada con los cuatro plásmidos del metabolismo de la L-arabinosa, con una cepa de tipo salvaje haploide. Posteriormente, se investigó el crecimiento en L-arabinosa. La cepa mutante diploide presentó un crecimiento más rápido en L-arabinosa que la cepa diploide control. Sin embargo, la cepa mutante diploide no creció tan bien como la cepa mutante haploide transformada con los cuatro plásmidos. La
10 cepa mutante diploide se esporuló y se llevó a cabo un análisis de tétradas. Los resultados indican que existe más de una mutación en el genoma de la cepa siendo al menos una dominante y siendo otra recesiva.

Más aún, la sobreexpresión de *TAL1* (transaldolasa) de *S. cerevisiae* junto a *araA* (L-arabinosa isomerasa) de
15 *B. subtilis*, *araB* (L-ribuloquinasa) mutante de *E. coli*, y *araD* (L-ribulosa-5-P 4-epimerasa) de *E. coli* resultó en crecimiento en L-arabinosa en la cepa CEN.PK2-1C de tipo salvaje.

La producción de etanol se determinó con la cepa JBY25 mutante transformada con los cuatro plásmidos re-aislados y se incubó en un medio de crecimiento con 20 g/L de L-arabinosa. Bajo condiciones limitantes de oxígeno en un cultivo con $DO_{600nm} = 15$ a 20, las velocidades de producción de etanol alcanzaron hasta 0,06 g de etanol/g de
20 peso seco y hora.

Hemos demostrado que es posible transferir el método para producir una cepa de levadura que utiliza L-arabinosa a otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que son diferentes de las cepas CEN.PK.

25 Hemos utilizado la cepa W303 de *S. cerevisiae* que no está relacionada con las cepas CEN.PK, y hemos transformado esta cepa con los plásmidos que expresan el gen *araA* (L-arabinosa isomerasa) de *B. subtilis*, el gen *araB* mutante con actividad reducida (L-ribuloquinasa) de *E. coli*, el gen *araD* (L-ribulosa-5-P 4-epimerasa) de *E. coli*, y el gen *TAL1* (transaldolasa) de *S. cerevisiae*.

30 Los transformantes podrían crecer en un medio definido con L-arabinosa como única fuente de carbono, aunque muy lentamente. Después, las células se incubaron durante varios días en medio líquido (sintético completo/0,1% extracto de levadura/0,2% peptona) teniendo L-arabinosa como única fuente de carbono. Después de 4 a 5 días de incubación, los transformantes empezaron a crecer más rápido en este medio, al contrario que una cepa W303 que contiene sólo cuatro vectores vacíos. Cuando las células alcanzaron una DO_{600} de 3 a 4, se inocularon en medio fresco a una DO_{600} de 0,3, y se crecieron adicionalmente. Finalmente, después de 20 días esto resultó en una cepa capaz de
35 crecer mucho más rápido en medio con L-arabinosa, y capaz de fermentar L-arabinosa a etanol.

La invención es una cepa de levadura modificada que expresa el gen *araA* (L-arabinosa isomerasa) de *B. subtilis*, gen *araB* mutante (L-ribuloquinasa D¹²¹-N) de *E. coli* y gen *araD* (L-ribulosa-5-P 4-epimerasa) de *E. coli* bacterianos,
40 y que porta mutaciones adicionales en su genoma o sobreexpresa el gen *TAL1* (transaldolasa) de *S. cerevisiae*, que le permite consumir L-arabinosa, utilizar ésta como única fuente de carbono, y producir etanol.

Normalmente, el medio de crecimiento contendrá aproximadamente 20 g de L-arabinosa/L. Sin embargo, el crecimiento y la producción de etanol se producirán entre 2 y 200 g/L. No existe la necesidad de azúcares adicionales y,
45 por lo tanto, puede utilizarse sólo L-arabinosa. Es posible que pudiera funcionar el co-consumo de xilosa y arabinosa, aunque hasta ahora esto no se ha determinado.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir una cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza L-arabinosa para la producción de etanol, **caracterizado** porque una cepa de levadura se modifica mediante la introducción y expresión de un gen *araA* (L-arabinosa isomerasa), un gen *araB* (L-ribuloquinasa), y un gen *araD* (L-ribulosa-5-P 4-epimerasa), y que porta mutaciones adicionales en su genoma o sobreexpresa un gen *TAL1* (transaldolasa), que le permite consumir L-arabinosa y producir etanol a partir de un medio que comprende L-arabinosa, mediante el que la cepa de levadura se modifica adicionalmente mediante la expresión de una forma mutante de la enzima L-ribuloquinasa de *E. coli* con una actividad reducida.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el gen *araA* es un gen *araA* de *B. subtilis*.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el gen *araA* es un gen *araA* de *M. smegmatis*.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, en el que el gen *araB* es un gen *araB* de *E. coli*.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el gen *araD* es un gen *araD* de *E. coli*.
- 20 6. Método según la reivindicación 1, en el que el gen *TAL1* es un gen *TAL1* de *S. cerevisiae*.
7. Método según la reivindicación 1, en el que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es una cepa CEN.PK, preferiblemente CEN.PK2-1C.
- 25 8. Método según la reivindicación 1, en el que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303.
9. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la cepa de levadura se modifica adicionalmente mediante la sobreexpresión del gen *GAL2* de levadura.
- 30 10. Método según la reivindicación 1, en el que el gen *araB* se sitúa detrás de un promotor débil.
11. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las modificaciones se realizan detrás del fragmento de promotor fuerte *HXT7* en vectores multicopia en cepas CEN.PK de *S. cerevisiae*.
- 35 12. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las modificaciones se realizan detrás del fragmento de promotor fuerte *HXT7* en vectores multicopia en cepas W303 de *Saccharomyces cerevisiae*.
13. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la cantidad de L-arabinosa en el medio de crecimiento es 2 a 200 g/L.
- 40 14. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la cepa es la cepa JBY25-4M de *Saccharomyces cerevisiae* con el número de referencia DSM 15560.
- 45 15. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la cepa es la cepa JBY24-3T de *Saccharomyces cerevisiae* con el número de referencia DSM 15559.
16. Método para producir etanol mediante levaduras fermentadoras, **caracterizado** porque una levadura modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 fermenta un medio de crecimiento que contiene L-arabinosa.
- 50 17. Método según la reivindicación 16, en el que la cantidad de L-arabinosa en el medio de crecimiento es 2 a 200 g/L.

55

60

65