



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 385**

51 Int. Cl.:  
**C12P 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08843461 .8**

96 Fecha de presentación : **30.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2205753**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2010**

54 Título: **Proceso para la producción de etanol en un medio que comprende xilosa que emplea una cepa de *Zymomonas* recombinante con expresión de *himA* reducida.**

30 Prioridad: **30.10.2007 US 983761 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2011**

73 Titular/es:  
**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY  
1007 Market Street  
Wilmington, Delaware 19898, US  
ALLIANCE FOR SUSTAINABLE ENERGY, L.L.C.**

72 Inventor/es: **Viitanen, Paul, V.;**  
**Tao, Luan;**  
**Knoke, Kyle;**  
**Zhang, Yuying;**  
**Caimi, Perry, G.;**  
**Zhang, Min;**  
**Chou, Yat-Chen y**  
**Franden, Mary Ann**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 385 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

Proceso para la producción de etanol en un medio que comprende xilosa que emplea una cepa de *Zymomonas* recombinante con expresión de *hima* reducida.

## REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUD RELACIONADA

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EEUU No. 60/983761, presentada el 30 de octubre, 2007.

## DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DEL GOBIERNO

- 10 Esta invención se hizo con el apoyo del Gobierno de los Estados Unidos con el Contrato No. 04-03-CA-70224 otorgado por el Departamento de Energía y el Contrato No. DE-AC36-08GO28308 entre el Departamento de Energía de los Estados Unidos y la Alianza para Energía Sostenible, LLC, el Gerente y Operador del Laboratorio Nacional de Energía Renovable. El Gobierno de EEUU tiene determinados derechos en esta invención.

## CAMPO DE LA INVENCION

- 15 La invención se refiere a los campos de la microbiología y la ingeniería genética. Más específicamente, se encontró que el gen *hima*, que codifica la subunidad alfa del factor de integración del anfitrión, estaba implicado en la tolerancia al acetato de *Zymomonas*. Se desarrolló una cepa de *Zymomonas* que utiliza xilosa con una modificación genética en el gen *hima*, que presenta una producción mejorada de etanol en presencia de acetato.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 20 La producción de etanol por microorganismos proporciona una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles y, por lo tanto, es un área importante de investigación actual. *Zymomonas mobilis* es un etanológeno bacteriano que crece en glucosa, fructosa y sacarosa, metabolizando estos azúcares a CO<sub>2</sub> y etanol a través de la ruta Entner-Doudoroff.

- 25 Es deseable usar biomasa lignocelulósica hidrolizada que puede proporcionar un sustrato de carbono disponible de manera abundante y de bajo coste para usarse en la fermentación para la producción de etanol. La xilosa es la pentosa principal en los materiales lignocelulósicos hidrolizados. Aunque las cepas de tipo salvaje de *Z. mobilis* no pueden usar xilosa como fuente de carbono, se han obtenido por ingeniería cepas recombinantes que son capaces de crecer en este azúcar (EEUU 5514583, EEUU 5712133, WO 95/28476, Feldmann et al. (1992) Appl Microbiol Biotechnol 38: 354-361, Zhang et al. (1995) Science 267: 240-243). Estas cepas están modificadas para la expresión de cuatro enzimas necesarias para el metabolismo de la xilosa: 1) xilosa isomerasa, que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa; 2) xiluloquinasa, que fosforila la xilulosa para formar xilulosa 5-fosfato; 3) transcetolasa; y 4) transaldolasa (EEUU 5514583, EEUU 6566107; Zhang et al. (1995) Science 267: 240-243). Equipadas con estas cuatro enzimas y la maquinaria metabólica normal de la célula, tres moléculas de xilosa se convierten en dos moléculas de glucosa 6-fosfato y una molécula de gliceraldehído 3-fosfato, que se convierten posteriormente en etanol y CO<sub>2</sub> en la parte de la glucosa de la ruta (Figura 1).

- 35 Aunque se ha tenido éxito en la modificación por ingeniería de cepas de *Z. mobilis* para el metabolismo de la xilosa, las cepas no crecen ni producen etanol tan bien en xilosa como en glucosa. Incluso en circunstancias ideales, el metabolismo de la xilosa es de 3 a 4 veces más lento que el metabolismo de la glucosa (Lawford et al. (2000) Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86: 277-293) y la diferencia es mucho mayor en condiciones adversas. Debido al flujo lento del carbono, el nivel de ATP en estado estacionario también es más bajo con el crecimiento en xilosa (Kim et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1): 186-193) y, como resultado, *Z. mobilis* es mucho más susceptible al estrés y a inhibidores cuando se crece en este azúcar (Joachimsthal et al. (2000) Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86: 343-356; Kim et al. (2000) Applied Biochemistry and Biotechnology 84-6: 357-370). Un estrés particular encontrado con el uso de biomasa lignocelulósica hidrolizada para la fermentación es la presencia de acetato (Kim et al. (2000) Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86: 357-370) que se libera de los restos de xilosa acetilados en la hemicelulosa durante los procesos de pretratamiento y sacarificación.

- 45 El documento FREUNDLICH, M. ET AL.: "The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*" (MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 6, no. 18, 1992, páginas 2557-2563) describe una cepa de *Escherichia coli* modificada genéticamente que tiene una expresión génica delecionada de *hima* o *himaAD*, que da lugar a un crecimiento reducido en presencia de acetato.

- 50 Los mecanismos para que *Z. mobilis* haga frente al estrés relacionado con acetato y otros ácidos orgánicos no se han esclarecido y no hay publicaciones en la bibliografía acerca de genes que jueguen un papel en este proceso. Por lo tanto, actualmente no es una opción el uso de un diseño racional para obtener por ingeniería genética una cepa que

tenga una mayor resistencia al acetato. Por otra parte, se han descrito mutantes de *Z. mobilis* que tienen una mayor tolerancia para el acetato (Joachimsthal et al. (1998) Biotechnol. Lett. 20(2): 137-142; Jeon et al. (2002) Biotechnol. Lett. 24: 819-824; Solicitud de Patente de EEUU 20030162271). Para generar estos mutantes se usó la selección después de mutagénesis química aleatoria con nitrosoguanidina (NTG) pero los genes modificados que eran responsables del fenotipo resistente al acetato no se identificaron en ninguno de estos casos. Tampoco se determinó si se requería una mutación o múltiples mutaciones para un mejor comportamiento en la fermentación en la presencia de acetato. Así, actualmente no se sabe a partir de los estudios citados anteriormente cómo conferir tolerancia al acetato a otras cepas de *Z. mobilis* usando ingeniería genética dirigida.

Existe todavía una necesidad de identificar a los genes implicados en la tolerancia al acetato que pueden modificarse para producir cepas tolerantes al acetato de *Zymomonas* para la fermentación de hidrolizado, producido a partir de biomasa lignocelulósica pretratada y sacarificada, para producir etanol.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la producción de etanol usando cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa que tienen un comportamiento mejorado en presencia de acetato. Los solicitantes han descubierto que la tolerancia al acetato se ve afectada por el gen *himA* que codifica la subunidad alfa del factor de integración del anfitrión. Una *Zymomonas* que utiliza xilosa con una modificación genética en el gen *himA* tiene una tolerancia incrementada al acetato cuando se cultiva en mezclas concentradas de glucosa y xilosa en presencia de acetato. La modificación de *himA* proporciona una expresión reducida del gen *himA* endógeno. En estas condiciones, la utilización de xilosa y la producción de etanol son significativamente mayores para la cepa con *himA* modificado que para una cepa comparable que tiene una expresión normal del gen *himA*.

De acuerdo con esto, la invención proporciona un proceso para producir etanol a partir de un medio con mezcla de azúcares que comprende xilosa, que comprende:

(a) proporcionar una cepa de *Zymomonas* recombinante capaz de utilizar xilosa para producir etanol, comprendiendo dicha cepa al menos una modificación genética en el gen *himA* que reduce la expresión de la proteína de la subunidad alfa del factor de integración del anfitrión (HimA); y

(b) cultivar la cepa de (a) en un medio con mezcla de azúcares que comprende xilosa, en el que dicha cepa usa la xilosa como fuente de carbono para producir etanol.

#### DESCRIPCION BREVE DE LAS FIGURAS Y DESCRIPCIONES DE LAS SECUENCIAS

La invención puede entenderse en su totalidad a partir de la descripción detallada, las Figuras y las descripciones de secuencias adjuntas siguientes que forman una parte de esta solicitud.

La Figura 1 muestra un diagrama de las cuatro enzimas (en recuadros) que se han usado para modificar por ingeniería *Z. mobilis* para la utilización de xilosa y rutas bioquímicas para la producción de etanol usando xilosa.

La Figura 2 muestra un mapa plasmídico de pMODgap/aada, el plásmido que se usó para generar una biblioteca de inserción de transposón en ZW801-4.

La Figura 3 muestra un gráfico de crecimiento de ZW801-4 en una mezcla concentrada de glucosa y xilosa con dos cantidades diferentes de acetato.

La Figura 4 muestra gráficos de utilización de glucosa, utilización de xilosa y producción de etanol para el cultivo de la biblioteca de mutantes de inserción de transposón enriquecida en comparación con la cepa control, ZW801-4, en medio con 100 g/L de glucosa, 90 g/L de xilosa y 6 g/L de acetato (A) o con 105 g/L de glucosa, 100 g/L de xilosa y 9 g/L de acetato (B).

La Figura 5 muestra gráficos de crecimiento en medios que contienen glucosa para ZW801-4 (A) y el mutante de inserción de transposón, AcR#3 (B) con diferentes cantidades de acetato de potasio.

La Figura 6 muestra gráficos de valores de punto final para el crecimiento en medios que contienen glucosa a las 43h para ZW801-4 (A) y el mutante de inserción de transposón AcR#3 (B) con diferentes sales de acetato.

La Figura 7 muestra un gráfico de utilización de glucosa, utilización de xilosa y producción de etanol para AcR#3 y ZW801-4 en medio con 105 g/L de glucosa, 100 g/L de xilosa y 9 g/L de acetato.

- La Figura 8 muestra gráficos de utilización de glucosa, utilización de xilosa y producción de etanol para ZW801-4 (A) y AcR#3 (B) en 100% medio Hidrolizado Simulado, que contiene ~9,5 g/L de acetato y 190 mM de iones amonio, con 110 g/L de glucosa y 90 g/L de xilosa.
- 5 La Figura 9 muestra mapas de plásmidos hechos durante la construcción de un vector con el gen *himA* inactivado pLDHTc139#7 (A), pLDHTc139#7-9WW (B) y pLDHSp-9WW (C).
- La Figura 10A muestra la localización genómica de los cebadores usados para preparar ADN que flanquea *himA* para la inserción en el vector suicida *himA*, pHimA, y en la Figura 10B se muestra un mapa circular del plásmido pHimA.
- 10 La Figura 11 muestra gráficos de utilización de glucosa, utilización de xilosa y producción de etanol para ZW801-4 (A) y ZW801-4::Δ*himA* (B) en 100% de medio Hidrolizado Simulado, que contiene ~9,5 g/L de acetato y 190 mM de iones amonio, con 110 g/L de glucosa y 90 g/L de xilosa.
- La Figura 12 muestra gráficos de crecimiento en medios que contienen glucosa para ZW801-4 (A), AcR#3 (B) y ZW801-4::Δ*himA* (C) con 0 u 8 g/L de acetato añadido como la sal de potasio.
- 15 La invención puede entenderse en su totalidad a partir de la descripción detallada y las descripciones de secuencias adjuntas siguientes que forman una parte de esta solicitud.
- 20 Las secuencias siguientes cumplen con 37 C.F.R. 1.821-1.825 ("Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules") y son coherentes con el Estándar ST.25 (1998) de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO) y los requerimientos del listado de secuencias de EPO y PCT (Normas 5.2 y 49.5(a-bis) y la Sección 208 y Anejo C de las Instrucciones Administrativas). Los símbolos y formato usados para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos se ajustan a las normas mostradas en 37 C.F.R. §1.822.
- Se proporciona un Listado de Secuencias adjunto en Disco Compacto. Los Discos Compactos se presentan en duplicado y son idénticos entre sí. Los discos están marcados como "Copia 1 - Listado de Secuencias" y "Copia 2 Listado de Secuencias". Los discos contienen el archivo siguiente: CL4041 seq list.ST25.
- 25 SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos de la región codificadora de *himA* de *Zymomonas mobilis*.
- SEQ ID NOs:2 y 3 son las secuencias de nucleótidos de cebadores para la secuenciación de sitios de inserción de transposones.
- SEQ ID NOs:4 y 5 son las secuencias de nucleótidos de cebadores para la amplificación por PCR de un fragmento de ADN que contiene el gen *ldh* y algo de ADN circundante.
- 30 SEQ ID NOs:6 y 7 son las secuencias de nucleótidos de cebadores para la amplificación por PCR de un fragmento de ADN que contiene el casete de resistencia a tetraciclina de pACY184.
- SEQ ID NOs:8 y 9 son las secuencias de nucleótidos de oligos usados para preparar un sitio loxP para la inserción en el plásmido pLDHTc139#7.
- 35 SEQ ID NOs:10 y 11 son las secuencias de nucleótidos de oligos usados para preparar un sitio loxP para la inserción en el plásmido pLDHTc139#7-9W.
- SEQ ID NOs:12 y 13 son las secuencias de nucleótidos de cebadores para la amplificación por PCR de un fragmento de ADN que contiene el casete de resistencia a espectinomicina del plásmido pHP15578.
- SEQ ID NOs:14 y 15 son las secuencias de nucleótidos de cebadores para la amplificación por PCR de un fragmento de ADN que flanquea *himA* en 3'.
- 40 SEQ ID NOs:16 y 17 son las secuencias de nucleótidos de cebadores para la amplificación por PCR de un fragmento de ADN que flanquea *himA* en 5'.
- SEQ ID NOs:18 y 19 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores de PCR que se usaron para confirmar que había ocurrido un evento de entrecruzamiento simple entre el ADN que flanquea *himA* en 5' en pHimA y su equivalente cromosómico.

SEQ ID NOs:20 y 21 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores de PCR que se usaron para confirmar que había ocurrido un evento de entrecruzamiento simple entre el ADN que flanquea *himA* en 3' en pHimA y su equivalente cromosómico.

5 SEQ ID NOs:22 y 23 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores de PCR que se usaron para confirmar que había ocurrido un evento de entrecruzamiento doble entre las secuencias de ADN que flanquean *himA* en 5' y 3' en pHimA y el gen *himA* en el cromosoma.

SEQ ID NO:24 es la secuencia de nucleótidos completa de la región codificadora GFOR de *Z. mobilis*.

SEQ ID NO:25 es la secuencia de nucleótidos completa de la región codificadora GFOR interrumpida en ZW801-4 (desde el codón de comienzo original hasta el codón de parada original).

10 SEQ ID NO:26 es la secuencia de aminoácidos de la proteína HimA de *Z. mobilis*.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 La presente descripción describe procesos para producir etanol que comprenden cultivar cepas de *Zymomonas* recombinantes que utilizan xilosa en medio que comprende mezclas de azúcares, tales como glucosa, xilosa y acetato; en los que dichas cepas comprenden modificaciones en el gen *himA* endógeno de dichas cepas. La modificación en el gen *himA* reduce la expresión del gen y resulta en un comportamiento mejorado de las cepas de *Zymomonas* con *himA* modificado cuando se cultivan en medio como se describe en la presente memoria. El etanol producido por las cepas de *Zymomonas* con *himA* modificado puede usarse como una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles.

Las abreviaturas y definiciones siguientes se usarán para la interpretación de la especificación y las reivindicaciones.

"Factor de integración del anfitrión" se abrevia como IHF.

20 "Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, que puede incluir secuencias reguladoras antes (secuencias no codificadoras en 5') y después (secuencias no codificadoras en 3') de la secuencia codificadora. "Gen nativo" o "gen de tipo salvaje" se refiere a un gen tal y como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. De acuerdo con esto, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que se obtienen de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que se obtienen de la misma fuente pero que están dispuestas de una manera diferente a la encontrada en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" se refiere a un gen que normalmente no se encuentra en el organismo anfitrión pero que se introduce en el organismo anfitrión por transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o genes quiméricos.

30 El término "construcción genética" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que codifica la expresión de una o más proteínas específicas. En la construcción génica el gen puede ser de naturaleza nativa, quimérica o extraña. Típicamente, una construcción genética comprenderá una "secuencia codificadora". Una "secuencia codificadora" se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica.

35 "Promotor" o "Regiones de control del inicio" se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o ARN funcional. En general, una secuencia codificadora está localizada en 3' respecto a una secuencia promotora. Los promotores pueden obtenerse en su totalidad de un gen nativo o pueden estar compuestos por diferentes elementos obtenidos de diferentes promotores encontrados en la naturaleza o incluso pueden comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tipos de tejidos o células o en diferentes estadios del desarrollo o en respuesta a diferentes condiciones medioambientales. Los promotores que causan que un gen se exprese en la mayor parte de los tipos de células la mayoría de las veces se refieren comúnmente como "promotores constitutivos".

45 El término "expresión", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN con sentido (ARNm) o antisentido obtenida a partir de un gen. La expresión también puede referirse a la traducción de ARNm en un polipéptido. "Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. "Sobreexpresión" se refiere a la producción de un producto génico en organismos transgénicos que supera los niveles de producción en organismos normales o no transformados. "Cosupresión" se refiere a la producción de transcritos de ARN con sentido capaces de suprimir la expresión de genes extraños o endógenos idénticos o sustancialmente similares (EEUU 5.231.020).

El término "ARN mensajero (ARNm)", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al ARN que no tiene intrones y que puede traducirse en proteínas por la célula.

5 El término "gen no funcional", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un gen que no expresa la proteína codificada normalmente como en la cepa de tipo salvaje en la que el gen es endógeno. La expresión de un gen no funcional puede estar interrumpida a cualquier nivel, tal como la transcripción, procesamiento del ARN o traducción. Un gen no funcional tiene típicamente poca expresión o ninguna expresión de la proteína codificada. Sin embargo, también puede codificar una proteína modificada que tiene una actividad enzimática menor que la proteína de tipo salvaje.

10 El término "transformación", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico a un organismo anfitrión, lo que resulta en una herencia genéticamente estable. El ácido nucleico transferido puede estar en la forma de un plásmido mantenido en la célula anfitriona o parte del ácido nucleico transferido puede integrarse en el genoma de la célula anfitriona. Los organismos anfitriones que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se refieren como organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

15 Los términos "plásmido" y "vector", tal y como se usan en la presente memoria, se refieren a un elemento cromosómico extra que frecuentemente porta genes que no forman parte del metabolismo central de la célula y habitualmente en la forma de moléculas de ADN circulares bicatenarias. Dichos elementos pueden ser secuencias que se replican de forma autónoma, secuencias de integración en el genoma, secuencias de fago o nucleotídicas, lineales o circulares de un ADN o ARN mono o bicatenario, obtenidas de cualquier fuente, en las que varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que es capaz de introducir un fragmento de promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con la secuencia no traducida en 3' apropiada en una célula.

20 El término "unido de forma operativa" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de una se vea afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor se une de forma operativa con una secuencia codificadora cuando es capaz de afectar la expresión de esa secuencia codificadora (es decir, que la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras pueden unirse de forma operativa a secuencias reguladoras en orientación con sentido o antisentido.

25 El término "marcador seleccionable" significa un factor de identificación, habitualmente un gen de resistencia a antibiótico o compuesto químico, que es capaz de ser seleccionado tomando como base el efecto del gen del marcador, es decir, resistencia a un antibiótico, en el que el efecto se usa para seguir la herencia de un ácido nucleico de interés y/o para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés.

30 El término "alta concentración de mezcla de azúcares" se refiere a una concentración total de azúcares en el medio que resulta en la inhibición del crecimiento de *Zymomonas* que utilizan xilosa. Esto ocurre típicamente cuando la concentración total de azúcares supera aproximadamente 100 g/L y la intensidad del efecto es mayor a concentraciones de azúcar más altas. Sin embargo, la concentración exacta de azúcar a la que empieza a ocurrir la inhibición del crecimiento es muy dependiente de otros componentes del medio.

35 El término "azúcar fermentable" se refiere a oligosacáridos y monosacáridos que pueden usarse como una fuente de carbono por un microorganismo en un proceso de fermentación.

El término "lignocelulósico" se refiere a una composición que comprende tanto lignina como celulosa. El material lignocelulósico también puede comprender hemicelulosa.

40 El término "celulósico" se refiere a una composición que comprende celulosa y componentes adicionales, incluyendo hemicelulosa.

El término "sacarificación" se refiere a la producción de azúcares fermentables a partir de polisacáridos.

El término "biomasa pretratada" significa biomasa que ha sido sometida a pretratamiento antes de la sacarificación.

45 "Biomasa" se refiere a cualquier material celulósico o lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa y opcionalmente que comprenden además hemicelulosa, lignina, almidón, polisacáridos, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa también puede comprender componentes adicionales, tales como proteínas y/o lípidos. La biomasa puede obtenerse de una única fuente o la biomasa puede comprender una mezcla obtenida de más de una fuente; por ejemplo, la biomasa podría comprender una mezcla de mazorcas de maíz y forraje o fibra de maíz o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa incluye, pero no está limitada a, cultivos bioenergéticos, restos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, lodos de la fabricación de papel, residuos del jardín, residuos de madera y forestales. Los ejemplos de biomasa incluyen, pero no están limitados a, grano de maíz, mazorcas de maíz, 50 residuos de maíz tales como hoja de maíz, forraje de maíz, fibra de maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, cebada, paja de

cebada, heno, paja de arroz, pasto varilla, residuos de papel, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, serrín, arbustos y matas, verduras, frutas, flores y estiércol animal.

5 "Hidrolizado de biomasa" se refiere al producto que resulta de la sacarificación de la biomasa. La biomasa también puede pretratarse antes de la sacarificación.

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular estándar usadas aquí son muy conocidas en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 (de aquí en adelante "Maniatis"); y por Silhavy, T.J., Bannan, M.L. y Enquist, L.W. *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nueva York, 1984; y por Ausubel, F.M. et al., En *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing y Wiley-Interscience, 1987.

15 La presente descripción se refiere a cepas modificadas por ingeniería de *Zymomonas* que utilizan xilosa que tienen un comportamiento mejorado en presencia de acetato. El acetato es un inhibidor de *Zymomonas* que cuando está presente durante la fermentación, reduce el crecimiento y la producción de etanol. El acetato es un subproducto metabólico en *Zymomonas* y también es un componente de la biomasa pretratada y sacarificada. Por lo tanto, un reto en el uso de azúcares obtenidos de biomasa para la fermentación es superar los efectos inhibidores del acetato en el biocatalizador para una producción mejorada de etanol. En la presente memoria se muestra que una interrupción obtenida por ingeniería del gen *himA* endógeno en *Z. mobilis* que utiliza xilosa mejora el comportamiento de la fermentación, incluyendo la utilización de xilosa y la producción de etanol, cuando el medio de la fermentación comprende acetato. La presente invención se refiere a un proceso para producir etanol en el que las presentes cepas de *Zymomonas* se cultivan en medio que comprende xilosa.

#### Cepa anfitriona de *Zymomonas* que utiliza xilosa

25 Cualquier cepa de *Zymomonas*, incluyendo una cepa de *Z. mobilis*, que sea capaz de utilizar xilosa como fuente de carbono puede usarse como anfitrión para preparar las cepas usadas en la presente invención. Las cepas de *Zymomonas* que se han modificado por ingeniería para la fermentación de xilosa a etanol son particularmente útiles. Los genes endógenos pueden proporcionar parte de la ruta metabólica o pueden alterarse por cualquier técnica de manipulación genética conocida para proporcionar una proteína con actividad enzimática útil para el metabolismo de la xilosa. Por ejemplo, la transcetolasa endógena puede complementar otras actividades enzimáticas introducidas creando una ruta de utilización de la xilosa. Típicamente, se han introducido cuatro genes en *Z. mobilis* para la expresión de las

30 cuatro enzimas implicadas en el metabolismo de la xilosa (Figura 1) como se describe en EEUU 5514583. Éstos incluyen genes que codifican la xilosa isomerasa, que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa y xiluloquinasa que fosforila la xilulosa para formar xilulosa 5-fosfato. Además, la transcetolasa y transaldolasa, dos enzimas de la ruta de la pentosa fosfato, convierten la xilulosa 5-fosfato en intermedios (fructosa 6-fosfato y gliceraldehídos 3-fosfato) que acoplan el metabolismo de pentosas con la ruta glicolítica Entner-Doudoroff lo que permite el metabolismo de la xilosa a etanol. Las

35 secuencias de ADN que codifican estas enzimas pueden obtenerse de cualquiera de varios microorganismos que son capaces de metabolizar la xilosa, tales como bacterias entéricas y algunas levaduras y hongos. Las fuentes para las regiones codificadoras incluyen *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhodobacter*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Zymomonas*. Son particularmente útiles las regiones codificadoras de *E. coli*.

40 Las secuencias de ADN codificadoras se unen de forma operativa a promotores que se expresan en células de *Zymomonas* tales como el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (promotor GAP) de *Zymomonas* y enolasa (promotor ENO) de *Zymomonas*. Las regiones codificadoras pueden expresarse individualmente a partir de promotores o dos o más regiones codificadoras pueden unirse en un operón con expresión a partir del mismo promotor. Los genes quiméricos resultantes pueden introducirse en *Zymomonas* y mantenerse en un plásmido o integrarse en el

45 genoma usando, por ejemplo, recombinación homóloga, integración dirigida a sitio o integración aleatoria. Las cepas que utilizan xilosa que son particularmente útiles incluyen CP4 (pZB5) (EEUU 5514583), ATCC31821/pZB5 (EEUU 6566107), 8b (EEUU 20030162271; Mohagheghi et al., (2004) *Biotechnol. Lett.* 25; 321-325) y ZW658 (ATCC #PTA-7858).

50 Las cepas de *Zymomonas* que se modifican por ingeniería adicionalmente para utilizar azúcares distintos de la xilosa, que no usan normalmente, también pueden usarse en el presente proceso. Un ejemplo es una cepa de *Z. mobilis* que utiliza xilosa que se modificó por ingeniería adicionalmente para la utilización de arabinosa que se describe en EEUU 5843760.

También pueden usarse cepas de *Zymomonas* que se modifican por ingeniería adicionalmente para una producción reducida del subproducto xilitol no deseado. Estas cepas se describen en la solicitud de patente de EEUU de propiedad

conjunta y en tramitación con la presente #11/862566 y en la publicación de patente de EEUU en tramitación #EEUU20080187973 A1. Las cepas descritas ZW800, ZW801-4 y ZW801-6 tienen un gen interrumpido que codifica glucosa-fructosa óxidoreductasa (GFOR). La interrupción de la expresión del gen GFOR puede conseguirse usando los mismos métodos descritos a continuación para interrumpir el gen *himA*, usando la secuencia conocida de la región codificadora de GFOR (SEQ ID NO:24). Las secuencias de ADN que rodean la secuencia codificadora de GFOR también son útiles en algunos procedimientos de modificación y están disponibles para *Zymomonas* en la secuencia genómica completa (Registro de GenBank #AE008692). Se encontró que la expresión reducida de GFOR reducía la producción de xilitol e incrementaba la producción de etanol.

#### Descubrimiento de la implicación de *himA* en la tolerancia al acetato

Aunque la base mecanística para los efectos inhibidores del acetato en el crecimiento y productividad de *Zymomonas* se entienden razonablemente bien (Lawford et al. (1993) Applied Biochemistry and Biotechnology 39-40: 687-699; Kim et al. (2000) Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86: 357-370), los genes que juegan un papel en la tolerancia al acetato no se han identificado para este microorganismo. Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que la manipulación genética del gen *himA* permite a *Zymomonas* comportarse mejor en presencia de concentraciones inhibitoras de acetato. Específicamente, los solicitantes han encontrado que la interrupción del gen *himA* de *Zymomonas* mejora el crecimiento y la producción de etanol en medios que contienen acetato. El proceso de enriquecimiento de la biblioteca de mutantes que se usó para descubrir el papel de *himA* en la resistencia al acetato descrito en la presente memoria en los Ejemplos 1 y 2 es un método completamente sin sesgo y no estaba basado en ningún resultado predicho.

El descubrimiento de que la interrupción del gen *himA* de *Zymomonas* mejora el comportamiento en presencia de acetato es inesperado, ya que no hay indicaciones o sugerencias en la bibliografía de que este gen juegue un papel en la tolerancia al acetato para *Zymomonas* o cualquier otro microorganismo. La proteína codificada por el gen *himA*, referida en la presente memoria como proteína "HimA", es la subunidad alfa (SEQ ID NO:26) del factor de integración del anfitrión (IHF), una proteína que también incluye una subunidad beta codificada por el gen *himD*. Así, IHF es una proteína heterodimérica que está comprendida por dos subunidades muy relacionadas. IHF se ha estudiado en *E. coli* y se muestra que es una proteína de unión a ADN y plegado de ADN que está implicada en la recombinación del ADN, replicación del ADN y regulación de la expresión génica (Friedman (1988) Cell 55: 545-554; Arfin et al. (2000) J. Biol. Chem. 275: 29672-29684). Los experimentos de co-ocurrencia de expresión génica en *E. coli* han mostrado que la inactivación del gen *himA* altera significativamente el nivel de expresión de al menos 120 genes y que esta manipulación activa más genes de los que reprime (Arfin et al. (2000) J. Biol. Chem. 275: 29672-29684). También se sabe que el gen *himA* de *E. coli* se transcribe activamente al mayor nivel cuando se produce la transición de las células de la fase exponencial a la fase estacionaria y se piensa que el producto del gen *himA* juega un papel en este proceso. Así, *himA* influye en un amplio rango de procesos de ADN y es un regulador de la expresión génica en *E. coli* pero ninguno de los muchos genes que se piensa que regula está claramente relacionado con la tolerancia al acetato. Además, se ha examinado el análisis global de la expresión génica en *E. coli* después de la exposición a una concentración inhibitora de acetato usando micromatrices y de entre los 86 genes que se vieron influidos por este tratamiento no estaba el gen *himA* (Arnold et al. (2001) J. Bacteriol. 183: 2178-2186). Finalmente, no se sabe nada acerca del papel del gen *himA* en *Zymomonas*. Tampoco conocemos publicaciones en la bibliografía que muestren que la inactivación del gen *himA* resulte en ningún tipo de efecto beneficioso. Es más, es sorprendente que éste fuera el caso considerando el gran número de genes y proteínas que probablemente se vean influidas por esta manipulación. Por lo tanto, es razonable concluir que los expertos en la técnica no podrían haber predicho que la inactivación del gen *himA* conferiría una mayor tolerancia al acetato a *Z. mobilis* o cualquier otro microorganismo.

La proteína HimA de *Zymomonas* es idéntica en un 46% a la homóloga de *E. coli* (número de registro de GenBank NP\_416227). La proteína más relacionada conocida es el homólogo de HimA de *Sphingomonas wittichii* (número de registro de GenBank YP\_001264041) que es idéntica en un 67%, como se determina por una búsqueda tBLASTx frente a la base de datos de NCBI usando la región codificadora de *himA* de *Z. mobilis* (SEQ ID NO:1) como secuencia de búsqueda.

#### Alteración de la expresión del gen *himA*

Una cepa de *Z. mobilis* que utiliza xilosa usada en la presente invención se modifica genéticamente de manera que hay una expresión reducida o ausente de la proteína de la subunidad alfa del factor de integración del anfitrión (HimA). Típicamente, la reducción de la expresión de la proteína HimA se consigue mediante una modificación que reduce la expresión del gen *himA*. La reducción de la expresión de la proteína HimA puede incluir modificaciones que, por ejemplo, reducen la traducción del ARNm codificado o reduce la estabilidad de la proteína HimA. La expresión reducida de la proteína HimA resulta en un comportamiento mejorado en presencia de acetato. Para alterar la expresión de HimA puede usarse cualquier método de modificación genética conocido por el experto en la técnica para reducir la expresión de una proteína. Los métodos incluyen, pero no están limitados a, delección completa o de una parte del gen *himA*,

5 inserción de un fragmento de ADN en el gen *himA* (bien en la región promotora o codificadora) de manera que la proteína codificada no pueda expresarse, introducción de una mutación en la región codificadora de *himA* que añade un codón de parada o desplazamiento del marco de manera que no se expresa una proteína funcional e introducción de una o más mutaciones en la región codificadora de *himA* para alterar los aminoácidos de manera que se expresa una proteína no funcional o una proteína con menos actividad funcional. Además, la expresión de *himA* puede bloquearse por la expresión de un ARN antisentido o un ARN de interferencia y pueden introducirse construcciones que resultan en cosupresión. Todos estos métodos pueden llevarse a la práctica fácilmente por un experto en la técnica haciendo uso de la secuencia codificadora conocida de *himA* (SEQ ID NO:1) así como la secuencia de ADN de *Z. mobilis* que rodea la secuencia codificadora de *himA*, que está disponible en la secuencia genómica completa de *Z. mobilis* (Registro de GenBank #AE008692).

10 Un método particularmente adecuado para crear una cepa con *himA* genéticamente modificado, como se ejemplifica en la presente memoria en los Ejemplos 5 y 6, es usar recombinación homóloga mediada por las secuencias de ADN que flanquean *himA* unido a un gen de resistencia a espectinomicina u otro gen marcador, lo que da lugar a la inserción del gen marcador en la región codificadora de *himA* de manera que no se expresa una proteína funcional. Además, el gen marcador puede estar unido por sitios de recombinación específica de sitio, de manera que después de la expresión de la recombinasa específica de sitio correspondiente, el gen de resistencia se escinde del gen *himA*. La recombinación específica de sitio produce un sitio de recombinación que interrumpe la expresión del gen *himA*. El vector de recombinación homóloga puede construirse para producir también una delección en el gen *himA* después de la escisión del marcador, como es muy conocido por un experto en la técnica.

15 Se prefiere eliminar completamente la expresión de *himA*, sin embargo también es una realización de la presente invención una expresión muy reducida de *himA*. En este caso, un gen *himA* no funcional se refiere a que no funciona de una manera normal de manera que están presentes unos niveles de la proteína codificada menores de lo normal. Algunos métodos de inactivación génica pueden resultar en un nivel de expresión bajo remanente, tal como la cosupresión. En la presente memoria, una cepa con *himA* modificado se refiere a una cepa genéticamente modificada con al menos una modificación genética en el gen *himA* y una actividad de la enzima HimA reducida o ausente.

#### Comportamiento de la cepa con *himA* modificado

20 Una cepa de *Z. mobilis* que utiliza xilosa con *himA* modificado usada en la presente invención tiene un comportamiento mejorado cuando se cultiva en un medio con mezcla de azúcares que comprende una cantidad de xilosa. El medio también puede contener una cantidad de acetato. Es deseable usar azúcares que se producen por la sacarificación de biomasa en medio de cultivo para *Z. mobilis* que utiliza xilosa. Típicamente, la biomasa se pretrata, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Patente WO2004/081185 y en la publicación EEUU de propiedad conjunta y en tramitación con la presente EEUU20070031918A1 y se trata con enzimas de sacarificación como se revisa en Lynd, L.R., *et al.* (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66: 506-577). El producto hidrolizado del pretratamiento y sacarificación de la biomasa que contiene xilosa y otros azúcares (es decir, que es un "medio con mezcla de azúcares") también contiene típicamente acetato. La hemicelulosa de la biomasa contiene restos de xilosa acetilados y el acetato se libera bajo condiciones muy suaves. Aunque la eliminación del acetato de la biomasa procesada es una manera de resolver el problema, la incorporación de esta etapa incrementaría sustancialmente el coste de la fabricación de etanol celulósico. Consecuentemente, la capacidad de modificar por ingeniería cepas de *Z. mobilis* para proporcionar una mayor tolerancia al acetato es una mejora sustancial.

30 El comportamiento mejorado en presencia de acetato como se ensaya en la presente memoria incluye crecimiento, utilización de xilosa y producción de etanol. El comportamiento mejorado de una cepa de *Z. mobilis* que utiliza xilosa con *himA* modificado es respecto a una cepa con las mismas características genéticas (una cepa isogénica) pero que carece de una modificación en el gen *himA*. La cepa parental usada para la modificación genética del gen *himA* se usa típicamente en esta comparación. La mejora puede observarse a cualquier nivel de acetato en el que una cepa con *himA* no modificado no alcanza su potencial completo de crecimiento y producción de etanol. Dependiendo de la composición del medio y el control del pH, la mejora ocurre típicamente cuando la concentración de acetato es aproximadamente 5 g/L o mayor. El grado de "inhibición por acetato" también depende del pH ya que la especie inhibidora es realmente ácido acético y el equilibrio del ácido acético y acetato es dependiente del pH. Sin control del pH, *Z. mobilis* acidifica rápidamente el medio de cultivo, como otras bacterias gram-negativas. Con una caída del pH de 5,8 a 4,8, la concentración de ácido acético se incrementa 5 veces debido al pK<sub>A</sub> de ~4,8 del ácido acético. Así, la concentración real de ácido acético (el inhibidor) depende del pH del medio de cultivo así como la cantidad total de la especie protonada y no protonada que está presente en el medio de cultivo.

35 En una mezcla concentrada de glucosa y xilosa con acetato presente, las cepas con *himA* no modificado y modificado utilizan glucosa de manera similar bajo condiciones de pH controlado, consumiéndose la glucosa en gran medida antes de consumirse la xilosa. Sin embargo, durante la etapa tardía de la fermentación después de que se haya agotado toda

la glucosa la cepa con *himA* modificado es capaz de convertir más xilosa en etanol que la cepa parental isogénica que tiene una expresión normal del gen *himA*.

5 El nivel de la producción incrementada de etanol conferido por la modificación en el gen *himA* depende de los componentes del medio de cultivo en condiciones de pH controlado, incluyendo los niveles y proporciones de los tipos de azúcares y la presencia de otros inhibidores. Por ejemplo, en presencia de 126 g/L de glucosa, 107 g/L de xilosa y 10% de acetato hubo un incremento del 4% en la titulación de etanol para la cepa con *himA* modificado comparado con la cepa isogénica sin modificación en *himA*. Cuando el medio de cultivo también contiene otros inhibidores, la producción incrementada de etanol puede ser incluso mayor. Por ejemplo, en un medio hidrolizado simulado que incluye 110 g/L de glucosa, 90 g/L de xilosa, ~9,5 g/L de acetato y 190 mM de iones amonio (otro inhibidor del crecimiento de *Z. mobilis* (Agrawal (1989) *Biotechnology and Bioengineering* 34: 278-281) que puede estar presente en el hidrolizado de biomasa a esta concentración), hubo aproximadamente un incremento del 11% en la producción de etanol y una utilización más completa de la xilosa. Así, bajo condiciones más severas, la diferencia en la producción de etanol entre una cepa con *himA* modificado y una cepa isogénica con *himA* sin modificar podría ser incluso mayor que los ejemplos citados. Por ejemplo, a altas concentraciones de azúcar o cuando también están presentes otros inhibidores obtenidos del hidrolizado además de iones amonio y acetato. Por lo tanto, dependiendo de las condiciones del cultivo la mejora en la producción de etanol puede ser de al menos aproximadamente 4% o mayor.

#### Fermentación para la Producción de Etanol

20 En el proceso de la presente invención, la presente cepa que utiliza xilosa con *himA* modificado se cultiva en medio que contiene cualquier mezcla de azúcares que también incluye xilosa. En particular, la presente cepa puede cultivarse en hidrolizado de biomasa o una dilución de hidrolizado de biomasa. La sacarificación de la biomasa produce azúcares en un hidrolizado de biomasa que puede incluir típicamente una mezcla de xilosa con glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, manosa y/o arabinosa. Se prefiere una composición con mezcla de azúcares que incluye xilosa y glucosa, en la que pueden estar presentes azúcares adicionales. La proporción de los diferentes azúcares puede variar en la mezcla, representando la xilosa típicamente al menos aproximadamente 10% de la cantidad total de azúcares. Preferiblemente, 25 la xilosa está entre aproximadamente 40% y aproximadamente 60%. La fructosa está presente en azúcares producidos por la sacarificación de alguna biomasa tal como bagazo de caña de azúcar y puede reemplazar una parte de la xilosa o glucosa, de manera que la xilosa permanece como al menos aproximadamente 10% de la mezcla de azúcares. Además, la arabinosa se obtiene de la hemicelulosa y es así un componente típico de mezclas de azúcares obtenidas a partir de biomasa sacarificada que contiene hemicelulosa. Durante la fermentación con las presentes cepas, la xilosa es uno de los azúcares que se usa como fuente de carbono para la producción de etanol. Para una producción de etanol y eficacia de la fermentación máximas es deseable cultivar la presente cepa que utiliza xilosa con *himA* modificado en medio que contiene una mezcla concentrada de azúcares, incluyendo xilosa. Esto permite el uso directo de azúcares de la 30 sacarificación de la biomasa o el uso con poca dilución, reduciendo de esta manera los volúmenes de la fermentación, lo que es deseable para la producción de etanol a escala comercial. Se usan altas concentraciones de azúcares de manera que pueden producirse mayores concentraciones de etanol. La concentración de la mezcla de azúcares en el medio de la fermentación es típicamente al menos aproximadamente 120 g/L y hasta aproximadamente 300 g/L. Es particularmente útil una concentración alta de la mezcla de azúcares que está entre aproximadamente 150 g/L y aproximadamente 235 g/L.

40 En las condiciones de alta concentración de la mezcla de azúcares deseadas para la producción de etanol, puede incluirse el sorbitol en el medio de fermentación usado para cultivar *Z. mobilis* que utiliza xilosa con *himA* modificado como se describe en la publicación EEUU de propiedad conjunta y en tramitación con la presente #EEUU20080081358 A1. El sorbitol (D-Sorbitol y/o L-Sorbitol) puede estar presente en el medio a concentraciones que están entre aproximadamente 2 mM y 200 mM. Las concentraciones finales en el medio más adecuadas son concentraciones entre aproximadamente 2 mM y 100 mM, prefiriéndose las concentraciones entre 5 mM y 20 mM. El manitol puede usarse en 45 el medio en lugar del sorbitol o en combinación con el sorbitol. Además, se encontró que puede usarse galactitol y/o ribitol en lugar de o en combinación con sorbitol o manitol. El sorbitol, manitol, galactitol, ribitol o combinaciones de éstos se usan todos en las mismas concentraciones descritas para el sorbitol.

50 *Z. mobilis* se cultiva en el medio en el que ocurre la fermentación y se produce el etanol. La fermentación se lleva a cabo sin aire, oxígeno u otros gases añadidos (que pueden incluir condiciones tales como fermentación anaeróbica, microaeróbica o microaerófila) durante al menos aproximadamente 24 horas y puede llevarse a cabo durante 48 horas o más. El momento en el que se alcanza la máxima producción de etanol es variable, dependiendo de las condiciones de la fermentación. Típicamente, si están presentes inhibidores en el medio, se requiere un periodo de fermentación más largo. Las fermentaciones pueden llevarse a cabo a temperaturas que están en un intervalo entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C y a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5. Son particularmente 55 adecuadas las temperaturas entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C. También es particularmente adecuado mantener el pH al menos aproximadamente 1 unidad de pH por encima del pK<sub>a</sub> del ácido acético, llevando el pH a entre aproximadamente 5,8 y 7,5, para disminuir la proporción de ácido acético a acetato.

5 *Z. mobilis* que utiliza xilosa con *himA* modificado puede cultivarse en medio que contiene mezcla de azúcares incluyendo xilosa en fermentadores a escala de laboratorio y en fermentación a mayor escala cuando se producen cantidades comerciales de etanol. Además, el medio puede contener acetato como se ha descrito anteriormente. Cuando se desea la producción comercial de etanol, pueden aplicarse una variedad de metodologías de cultivo. Por ejemplo, puede producirse una producción a gran escala de *Z. mobilis* que utiliza xilosa con *himA* modificado tanto por metodologías de cultivo en discontinuo como continuo. Un método de cultivo discontinuo clásico es un sistema cerrado en el que la composición del medio se ajusta al principio del cultivo y no se somete a alteraciones artificiales durante el proceso de cultivo. Así, al principio del proceso de cultivo el medio se inocula con el organismo deseado y se permite que ocurra el crecimiento o actividad metabólica sin añadir nada al sistema. Típicamente, sin embargo, un cultivo "discontinuo" es discontinuo respecto a la adición de fuente de carbono y frecuentemente se intenta controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas discontinuos las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en el que se termina el cultivo. En los cultivos discontinuos, las células típicamente se moderan a través de una fase de latencia estática a una fase de crecimiento y finalmente a una fase estacionaria en la que la velocidad de crecimiento disminuye o se para. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria eventualmente morirán. Las células en la fase log frecuentemente son responsables de la mayor parte de la producción del producto final o intermedio en algunos sistemas. En otros sistemas puede obtenerse la producción en la fase estacionaria o postexponencial.

20 Una variación del sistema discontinuo estándar es el sistema de Alimentación Discontinua. Los procesos de cultivo con Alimentación Discontinua también son adecuados para el cultivo de *Z. mobilis* que utiliza xilosa con *himA* modificado y comprenden un sistema discontinuo típico con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos al progresar el cultivo. Los sistemas con Alimentación Discontinua son útiles cuando la represión por catabolitos es apta para inhibir el metabolismo de las células y en la que es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medida de la concentración real de sustrato en los sistemas con Alimentación Discontinua es difícil y se estima por lo tanto tomando como base los cambios de los factores mensurables tales como pH y presión parcial de gases de desecho tales como CO<sub>2</sub>. Los métodos de cultivo Discontinuos y con Alimentación Discontinua son comunes y muy conocidos en la técnica y pueden encontrarse ejemplos en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Crueger, Crueger, y Brock, Segunda Edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA o Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36, 227, (1992).

30 La producción comercial de etanol también puede conseguirse con un cultivo continuo. Los cultivos continuos son sistemas abiertos en los que se añade continuamente un medio de cultivo definido a un biorreactor y se elimina una cantidad igual de medio condicionado simultáneamente para procesamiento. Los cultivos continuos mantienen generalmente a las células en una alta densidad constante en fase líquida en la que las células están principalmente en la fase logarítmica de crecimiento. Alternativamente, el cultivo continuo puede ponerse en práctica con células inmovilizadas en el que el carbono y los nutrientes se añaden continuamente y los productos valiosos, subproductos o productos de desecho se eliminan continuamente de la masa celular. La inmovilización de las células puede realizarse usando un amplio rango de soportes sólidos compuestos por materiales naturales y/o sintéticos como conoce el experto en la técnica.

40 El cultivo continuo o semicontinuo permite la modulación de un factor o varios factores que influyen en el crecimiento, metabolismo celulares o concentración del producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno en una proporción fija y permitirá que se moderen todos los demás parámetros. En otros sistemas, pueden alterarse continuamente varios factores que influyen en el crecimiento o metabolismo mientras se mantiene constante la concentración celular, medida por la turbidez del medio. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener condiciones de crecimiento en estado estacionario y así debe equilibrarse la pérdida de células debida a la decantación del medio frente a la velocidad de crecimiento de las células en el cultivo. Los métodos para modular los nutrientes y factores de crecimiento para procesos de cultivo continuo así como las técnicas para maximizar la velocidad de formación del producto son muy conocidas en la técnica de microbiología industrial y Brock, *supra*, detalla una variedad de métodos.

50 Es particularmente adecuado para la producción de etanol un régimen de fermentación como sigue. La cepa de *Z. mobilis* que utiliza xilosa con *himA* modificado deseada se crece en matraces agitados en medio semicomplejo a aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C con agitación a aproximadamente 150 rpm en agitadores orbitales y se transfiere a un fermentador de siembra de 10 L que contiene un medio similar. El cultivo de siembra se crece en el fermentador de siembra anaeróbicamente hasta que la DO<sub>600</sub> es entre 3 y 6, momento en el que se transfiere al fermentador de producción en el que los parámetros de la fermentación se optimizan para la producción de etanol. Los volúmenes de inóculo típicos transferidos desde el tanque de siembra al tanque de producción varían de aproximadamente 2% a aproximadamente 20% v/v. El medio de fermentación típico contiene componentes de medio mínimos tales como fosfato de potasio (1,0-10,0 g/l), sulfato de amonio (0-2,0 g/l), sulfato de magnesio (0-5,0 g/l), una fuente de nitrógeno complejo tal como extracto de levadura o productos basados en soja (0-10 g/l). En el medio está presente una concentración final de aproximadamente 5 mM de sorbitol o manitol. Las mezclas de azúcares que

incluyen xilosa y al menos un azúcar adicional tal como glucosa (o sacarosa), que proporcionan una fuente de carbono, se añaden continuamente al recipiente de fermentación cuando se agota la fuente de carbono discontinua inicial (50-200 g/l) para maximizar la proporción y titulación del etanol. Las velocidades de alimentación de la fuente de carbono se ajustan dinámicamente para asegurar que el cultivo no acumula glucosa en exceso, lo que podría dar lugar a la acumulación de subproductos tóxicos tales como ácido acético. Con el fin de maximizar el rendimiento del etanol producido a partir del sustrato utilizado, el crecimiento de la biomasa se restringe por la cantidad de fosfato que se alimenta inicialmente o que se alimenta durante el curso de la fermentación. El pH del caldo de fermentación se controla/mantiene por la adición automatizada de base usando hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio u otras bases fuertes. La temperatura del fermentador se controla en el intervalo deseado. Con el fin de minimizar la formación de espuma, se añaden agentes antiespumantes (cualquier clase basada en silicona, basada en orgánicos, etc) al recipiente según se necesite. Puede usarse opcionalmente un antibiótico, tal como kanamicina, para el que hay un marcador de resistencia a antibiótico en la cepa para minimizar la contaminación.

Cualquier conjunto de condiciones descrito anteriormente, y variaciones adicionales en estas condiciones que son muy conocidas por un experto en la técnica, son condiciones adecuadas para la producción de etanol por las presentes cepas de *Zymomonas* recombinantes que utilizan xilosa con *himA* modificado.

## Ejemplos

### MÉTODOS GENERALES

Las técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular usadas aquí son muy conocidas en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (de aquí en adelante en la presente memoria "Maniatis"); y por Silhavy, T.J., Bannan, M.L. y Enquist, L.W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); y por Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987).

El significado de las abreviaturas es como sigue: "kb" significa kilobase(s), "pb" significa pares de bases, "nt" significa nucleótido(s), "hr" significa hora(s), "min" significa minuto(s), "seg" significa segundo(s), "d" significa día(s), "L" significa litro(s), "ml" significa mililitro(s), "μL" significa microlitro(s), "μg" significa microgramo(s), "ng" significa nanogramo(s), "g" significa gramos, "mM" significa milimolar, "μM" significa micromolar, "nm" significa nanometro(s), "μmol" significa micromol(es), "pmol" significa picomol(es), "Cm" significa cloranfenicol, "Cm<sup>r</sup>" significa resistente a cloranfenicol, "Spec<sup>r</sup>" significa resistencia a espectinomicina, "cfu" significa unidades formadoras de colonias, "DO<sub>600</sub>" significa densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nanómetros, "SE" significa error estándar, "rpm" significa revoluciones por minuto, "~" significa aproximadamente.

### Ejemplo 1

#### Generación de una biblioteca de inactivación/sobreexpresión basada en transposón en ZW801-4

Se construyó una biblioteca genómica de inactivación/sobreexpresión basada en transposón en una cepa de *Z. mobilis* recombinante que utiliza xilosa para cribar mutantes resistentes al acetato. Hubo dos razones principales para usar un transposón para generar la biblioteca. En primer lugar, es un método absolutamente sin sesgo que no requiere ningún conocimiento previo acerca de los genes que juegan un papel en la tolerancia al acetato. En segundo lugar, es fácil identificar el gen interrumpido que es responsable del fenotipo deseado ya que está "etiquetado" con un marcador seleccionable. La cepa que se usó para generar la biblioteca fue ZW801-4. Como se describe con detalle en la solicitud de patente EEUU # 60/847813, ZW801-4 se obtuvo a partir de ZW658 (ATCC # PTA-7858) a través de una cepa intermedia, ZW800. La última cepa se construyó por inserción por entrecruzamiento doble desde un plásmido suicida de un casete de resistencia a espectinomicina (casete Spec<sup>r</sup>), flanqueado por sitios loxP de tipo salvaje, en el gen que codifica la glucosa-fructosa óxidoreductasa (GFOR). Se mostró que el mutante resultante con GFOR inactivado tenía una producción reducida de xilitol, un subproducto perjudicial del metabolismo de la xilosa y una mejor producción de etanol durante la fermentación de mezclas de azúcares con glucosa y xilosa. ZW800 se convirtió en ZW801-4 mediante escisión mediada por Cre del casete Spec<sup>r</sup>. La eliminación del marcador seleccionable dejó un único sitio loxP de tipo salvaje en el medio del marco de lectura abierto de GFOR, lo que resultó en un codón de parada en marco que trunca prematuramente la traducción de la proteína. Además, la secuencia codificadora de GFOR en ZW801-4 carece de ~72 pb de la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje original de GFOR en la región que está alrededor del sitio loxP como resultado del diseño de la construcción suicida. La secuencia de la región codificadora de GFOR mutante en ZW801-4 se proporciona como SEQ ID NO:25. Como su predecesor inmediato (ZW800), ZW801-4 no genera ningún xilitol detectable ya que no produce una enzima GFOR funcional.

La metodología que se usó para generar la biblioteca genómica de inactivación/sobreexpresión de ZW801-4 se basó en la tecnología de transposoma Epicentre (Madison, WI) usando el Vector de Construcción de Transposón pMOD<sup>TM</sup>-2<MCS> (No. Cat. MOD0602). Este plásmido incluye un gen de resistencia a ampicilina (amp<sup>R</sup>), un origen de replicación de *E. coli* (ori) y un sitio de multiclonación que está situado entre los dos extremos en mosaico (ME) con el que interacciona la transposasa Tn5. Para la aplicación en la presente invención, pMOD<sup>TM</sup>-2<MCS> se convirtió en pMODgap/aadA, mostrado en la Figura 2, insertando un casete Spec<sup>r</sup> (que tiene su propio promotor) y el promotor constitutivo fuerte para el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Pgap) de *Z. mobilis* en el sitio de multiclonación que está situado entre los dos ME; el promotor Pgap y el casete Spec<sup>r</sup> están orientados en direcciones opuestas. Así, el fragmento de ADN que se insertó aleatoriamente en el cromosoma de *Z. mobilis* durante la transposición usando esta construcción contenía tanto el casete Spec<sup>r</sup> como el promotor Pgap. El promotor Pgap se añadió al transposón para incrementar la diversidad genética de la biblioteca ya que puede alterar potencialmente la expresión de los genes cromosómicos de *Z. mobilis* que están adyacentes al sitio de inserción del transposón.

La biblioteca genómica de inactivación/sobreexpresión de ZW801-4 consistió en ~17.500 mutantes independientes y la titulación de la preparación madre de glicerol fue ~7,1 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (cfu) Spec<sup>r</sup> por mililitro. Esto se traduce en ~1 evento de inserción de transposón/115 nucleótidos, que es aproximadamente 8x la cobertura del genoma completo, tomando como base la inserción aleatoria del transposón y ~2.000 genes con un tamaño medio de ~1 kb. Debido a la baja frecuencia de transformación de *Z. mobilis*, se esperaba que ninguno o muy pocos de los mutantes hubiera tenido más de un inserto de transposón.

#### Ejemplo 2

#### 20 Cribado de la biblioteca de inactivación/sobreexpresión basada en transposón de ZW801-4 para mutantes con mayor tolerancia al acetato

La biblioteca genómica de inactivación/sobreexpresión de ZW801-4 se cribó para los mutantes resistentes al acetato como se describe a continuación. Antes de hacer esto, sin embargo, era importante poner a punto las condiciones de selección apropiadas para el proceso de enriquecimiento de mutantes. El objetivo fue encontrar una concentración de acetato que ralentizara la velocidad de crecimiento al menos por un factor de dos, pero que aún así permitiera que las células se dividieran durante varias generaciones de manera que pudieran acumularse los mutantes que crecieran más rápidamente. También era importante hacer esto bajo condiciones relevantes para el proceso en una mezcla concentrada de glucosa y xilosa ya que experimentos previos han mostrado que el estrés osmótico y el acetato inhiben ambos el crecimiento de una manera sinérgica. Finalmente, el control del pH también era crítico ya que el compuesto inhibitor real es el ácido acético y la proporción de las especies protonadas respecto a las especies no protonadas se incrementaría dramáticamente sin control del pH porque las células bacterianas acidifican el medio de crecimiento. Por ejemplo, si el pH cayera de 5,8 a 4,8, la concentración de ácido acético se incrementaría aproximadamente 5 veces porque el pK<sub>A</sub> de este ácido orgánico débil es ~4,8.

La Figura 3 muestra los efectos inhibitorios de dos concentraciones diferentes de acetato en la velocidad de crecimiento y el rendimiento final de biomasa de ZW801-4, la cepa que se usó para generar la biblioteca. Para estos experimentos se usó acetato de potasio y las concentraciones finales que se proporcionan a continuación están basadas en el componente acetato de la sal añadida en gramos por litro. Los biorreactores con pH controlado contenían medio mRM3S (10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 5 mM de sorbitol) más 100 g/L de glucosa, 90 g/L de xilosa y 5 g/L ó 6 g/L de acetato; el pH y la temperatura fueron 5,8 y 30°C y la agitación fue a 150 rpm. Tomando como base los resultados mostrados en la Figura 3 y otros experimentos, se eligió 5 g/L de acetato para el cribado de la biblioteca, ya que esta concentración del inhibidor satisfacía ambos criterios para el crecimiento como se ha indicado anteriormente.

Para enriquecer para mutantes resistentes al acetato se usó el protocolo siguiente. Una alícuota (2 ml) de la preparación madre de glicerol de la biblioteca (DO<sub>600</sub>=4,3; ~7,1 x 10<sup>8</sup> Spec<sup>r</sup> (cfu/ml) se añadió a 20 ml de medio SM (10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 75 g/L de glucosa, 25 g/L de xilosa, pH inicial 5,8) y el cultivo se incubó durante 1,5 horas a 30°C. Después de este periodo de recuperación, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 2,0 ml del mismo medio de crecimiento. Una alícuota (10 µl) de la suspensión celular (~7 x 10<sup>6</sup> cfu Spec<sup>r</sup>) se inoculó en 15 ml de medio mRM3S que contenía 100 g/L de glucosa, 90 g/L de xilosa y 4 g/L de bicarbonato de potasio para ayudar a minimizar los cambios del pH; el pH inicial se ajustó a 5,8 con ácido fosfórico concentrado antes de añadir las células y la DO<sub>600</sub> inicial fue ~0,0025. Éste fue el cultivo de siembra que se usó para el procedimiento de enriquecimiento de mutantes. Se creció a 30°C a DO<sub>600</sub> de ~0,5 y 7,5 ml se inocularon en un biorreactor con pH controlado. El cultivo final de 150 ml contenía medio mRM3S más 100 g/L de glucosa, 90 g/L de xilosa, 5g/L de acetato y el pH se mantuvo a 5,8 por la adición automatizada de KOH. Después de ~24 horas de crecimiento a 30°C, se transfirió una alícuota del cultivo (DO<sub>600</sub> ~0,5) a un nuevo biorreactor que contenía medio de crecimiento fresco con la misma composición a una DO<sub>600</sub> inicial de ~0,02. Esta etapa se repitió seis veces más

esencialmente como se ha descrito anteriormente. En general, las células se transfirieron cada 24-36 horas y la DO inicial en el biorreactor fue ~0,02 a ~0,03. Así, hubo al menos cinco generaciones entre las transferencias. Después del séptimo ciclo del procedimiento de enriquecimiento de mutantes, se preparó una preparación madre de glicerol del cultivo para una caracterización adicional.

5 La Figura 4A muestra los resultados de un experimento en biorreactor con pH controlado con altas concentraciones de azúcar y acetato que se realizó con el cultivo enriquecido en mutantes después de la séptima transferencia. El control para este experimento fue la cepa parental, ZW801-4. Los cultivos de siembra se crecieron a 30°C en medio SM a una DO<sub>600</sub> de ~4,5 y los biorreactores empezaron con un inóculo de 10%. Los cultivos finales de 150 ml contenían medio mRM3S más 100 g/L de glucosa, 90 g/L de xilosa y 6 g/L de acetato. La agitación fue a 150 rpm y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 30°C, respectivamente. A varios tiempos, se tomaron alicuotas de 1,0 ml de los cultivos para análisis por HPLC usando un HP 1100 equipado con un detector de índice de refracción (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) para determinar las concentraciones de glucosa, xilosa y etanol que estaban presentes en el caldo de fermentación. Antes del análisis por HPLC, las células se recogieron por centrifugación y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de tubo de centrifuga de acetato de celulosa de 0,22 µm Spin-X (Costar, número de catálogo 8160) para eliminar las partículas pequeñas. Los compuestos se separaron en una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) que se corrió a 55°C bajo condiciones isocráticas usando una velocidad de caudal de 0,6 ml/min y 0,01 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvil. Se usaron estándares auténticos de concentración conocida para cuantificar los picos de interés y los resultados se expresaron en g/L.

20 Los resultados proporcionados en la Figura 4A muestran que el cultivo de la biblioteca enriquecida en mutantes presentaba una utilización de xilosa más rápida y una producción de etanol más rápida durante la última etapa de la fermentación. Obsérvese que esto ocurrió después de que se agotara toda la glucosa y la concentración de etanol se aproximaba a niveles tóxicos. Sin embargo, al final del experimento ambos cultivos habían consumido todo el azúcar y habían producido la misma cantidad de etanol. Cuando este experimento se repitió usando una concentración de azúcar ligeramente más alta (105 g/L de glucosa y 100 g/L de xilosa) y más acetato (9 g/L) se observó un fenómeno similar (Fig. 4B) demostrando así que los resultados eran reproducibles.

### Ejemplo 3

#### Caracterización Genética de las Cepas Mutantes

30 Para ver qué tipos de mutantes fueron enriquecidos durante el proceso de selección, se aislaron colonias individuales a partir del cultivo de la biblioteca durante el segundo experimento en biorreactor (Figura 4B). Se tomó una alicuota del cultivo en el punto de tiempo de 24 hr y las células se crecieron en placas de agar que contenían medio MMG (50 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1 mM de MgSO<sub>4</sub>). Después de un periodo de incubación de 48 hr a 30°C bajo condiciones anaeróbicas, diecisiete de las colonias resultantes se seleccionaron aleatoriamente para el análisis de la secuencia de ADN para determinar el o los sitios de la inserción del transposón. Para este análisis se usó el procedimiento siguiente. Las colonias se diluyeron en 50 µl de agua y el ADN genómico se amplificó usando el Kit de Amplificación GenomiPHI (GE Healthcare Life Sciences No. de Cat. 25-6600-1). Brevemente, 1 µl de la suspensión celular se añadió a 9 µl del Reactivo de Lisis y la mezcla se calentó hasta 95°C durante 3 min e inmediatamente se enfrió hasta 4°C. A continuación, se añadieron 9 µl del Tampón de la Enzima y 1 µl de ADN polimerasa Phi 29 a las muestras lisadas. Después de 18 horas de amplificación a 30°C, la polimerasa se inactivó con calor durante 10 min a 65°C y la muestra se enfrió inmediatamente hasta 4°C.

40 Una alicuota de la muestra amplificada (8 µl) se añadió a 16 µl de Reactivo de Secuenciación BigDye v3.1 (PN #4337457 Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 µl de Termofidelsa (Fidelity Systems, Gaithersburg, MD), 12 µl de agua de Grado de Biología Molecular (Mediatech, Inc., Herndon, VA) y 3 µl de 10 µM de cebador: bien SpecT-FOR (SEQ ID NO:2: GTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTC) o SpecT-Rev (SEQ ID NO:3: CTACCTCTGATAGTTGAGTCGATACTTCGG). Obsérvese que estos dos cebadores hibridan con el casete Spec<sup>r</sup> que es parte del transposón que se usó para generar la biblioteca genómica de inactivación ZW801-4 pero están orientados en direcciones opuestas. Las reacciones de secuenciación se ciclaron térmicamente como sigue: 3 min a 96°C seguido de 200 ciclos de (95°C 30 seg + 55°C 20 seg + 60°C 2 min) y se almacenaron a 4°C. Antes de la secuenciación, se eliminaron los ddNTP no incorporados usando placas de limpieza Edge Biosystems (Gaithersburg, MD). La mezcla de reacción de secuenciación completa de 40 µl se pipeteó en un pocillo de una placa de limpieza de 96 pocillos precentrifugada y la placa se centrifugó durante 5 min a 5.000 x gravedad en una centrifuga refrigerada Sorvall RT-7. Las reacciones limpias se pusieron directamente en un secuenciador de ADN Applied Biosystems 3730 y se secuenciaron con lectura automática de nucleótidos.

55 Sorprendentemente, las 17 colonias que se secuenciaron tenían un transposón insertado en el marco de lectura abierto del gen *himA* (complemento inverso de los nucleótidos #1138224 a #1138565 del genoma de *Z. mobilis* (número de registro de GenBank AE008692)) y se identificaron tres eventos diferentes de inserción. Once de las colonias

(incluyendo AcR#3, véase a continuación) tenían un inserto de transposón en el nt #1138413, cuatro de las colonias tenían un inserto en el nt #1138267 y dos de las colonias tenían un inserto en el nt #1138508. Así, los tres eventos de inserción ocurrieron en una cadena de ADN de 250 pb. El hecho de que el 65% de los mutantes con inactivación de *himA* tuvieran un inserto de transposón en el nt #1138413 después del séptimo ciclo del procedimiento de enriquecimiento de mutantes sugirió que este evento puede haber conferido un crecimiento más rápido o una supervivencia mayor que los otros dos eventos de inserción. También hubo otra observación interesante del análisis de la secuencia. Aunque en teoría un transposón Tn5 puede insertarse él mismo en el ADN en cualquier dirección, los tres eventos de inserción que se recuperaron del proceso de selección tenían la misma orientación con el promotor Pgap apuntando hacia la dirección opuesta del marco de lectura abierto de *himA*.

10 Resulta evidente a partir de los resultados de secuenciación descritos anteriormente que los experimentos que se muestran en la Figura 4 se realizaron con una población mixta de células, no con una cepa purificada. Así, AcR#3 se eligió para una caracterización adicional del fenotipo *himA* ya que esta cepa tiene un inserto de transposón en el nt #1138413, que fue el evento que se aisló más frecuentemente.

#### Ejemplo 4

15 Efecto de la inactivación del gen *himA* en la tolerancia al acetato y el comportamiento en la fermentación bajo condiciones relevantes para el proceso

AcR#3 es más resistente al acetato que ZW801-4

20 El medio de crecimiento que se usó para el proceso de selección de mutantes contenía altas concentraciones de glucosa y xilosa, además de un nivel inhibitorio de acetato. Por lo tanto, era posible que el comportamiento mejorado en la fermentación que se observó después del séptimo ciclo de enriquecimiento (Figura 4) estuviera relacionado con estrés osmótico o mejor crecimiento en xilosa, ya que este azúcar no se utiliza tan bien como la glucosa. También era posible que se hubieran enriquecido los mutantes resistentes al etanol ya que presumiblemente éstos también crecerían más rápido o sobrevivirían más tiempo bajo las condiciones experimentales empleadas. Para descartar estas otras posibilidades y ver si la inactivación del gen *himA* realmente confiere una mayor tolerancia al acetato, la cepa AcR#3 se comparó con la cepa parental, ZW801-4 bajo las condiciones siguientes. El experimento se realizó a 33°C en matraces agitados (cultivos de 20 ml en tubos de 50 ml) y el medio de crecimiento contenía 10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 10 mM de KHCO<sub>3</sub> (para ayudar a mantener el pH), 50 g/L de glucosa y 0,8 ó 12 g/L de acetato, que se añadió como la sal de potasio; las concentraciones de acetato que se proporcionan están basadas en el componente acetato de la sal de potasio. El pH inicial se ajustó a 5,8 con ácido fosfórico antes de añadir las células y los cultivos se agitaron suavemente en un agitador recíproco (150 rpm). Los cultivos de siembra se crecieron hasta la fase exponencial tardía (DO<sub>600</sub>~1,4) en el mismo medio sin acetato y la DO<sub>600</sub> inicial para los cultivos experimentales fue 0,03. Es importante indicar que éstas son las condiciones ideales para el crecimiento de *Z. mobilis* en ausencia de acetato, ya que no hay estrés osmótico y la fuente de carbono es el sustrato preferido, glucosa. Además, la concentración más alta de etanol que podría generarse en este experimento es <25 g/L que tiene poco efecto o no tiene efecto en el crecimiento de *Z. mobilis*.

35 En ausencia de acetato, AcR#3 y ZW801-4 crecieron con cinéticas similares y produjeron la misma cantidad de biomasa medida a partir de los valores finales de DO<sub>600</sub> como se muestra en la Figura 5. La cepa AcR#3 (Figura 5B), sin embargo, tuvo una tolerancia mucho mayor al acetato que la cepa parental (Figura 5A). Por ejemplo, el crecimiento de ZW801-4 se suprimió casi completamente con 8 g/L de acetato, mientras que esta concentración del inhibidor tuvo un efecto despreciable en AcR#3. De hecho, el mutante con inactivación en *himA* fue más resistente a 12 g/L de acetato que lo fue ZW801-4 a 8 g/L de acetato. Este experimento se repitió y se obtuvieron los mismos resultados. Es importante recordar que el acetato tiene mayor actividad inhibitoria cuando el pH del medio de crecimiento no está controlado como lo estaba en los experimentos en biorreactor que se muestran en la Figura 4. En los experimentos en matraces agitados sin control del pH, las células acidifican el medio de crecimiento y la proporción ácido acético/acetato se incrementa dramáticamente y es la especie protonada la que inhibe el crecimiento bacteriano como ya se ha indicado.

40 Como los iones potasio podrían haber contribuido al menos parcialmente a la inhibición del crecimiento que se observó para ambas cepas en el experimento anterior, era importante ensayar otras fuentes de acetato. Las condiciones que se usaron para este conjunto de experimentos fueron idénticas a las descritas anteriormente, pero también se incluyeron en el análisis acetato de sodio y acetato de amonio. La concentración del ión acetato fue 8 g/L (como se ha definido anteriormente) en todos los casos. En la Figura 6 se muestran los valores finales de DO<sub>600</sub> para los distintos cultivos en el punto de tiempo de 43 hr. ZW801-4 (Fig. 6A) se inhibió fuertemente con 8 g/L de acetato, independientemente de la sal de acetato que se usó. Esta observación indica claramente que el inhibidor principal en estos experimentos era el ácido acético y que los cationes monovalentes en las sales de acetato tenían poco o ningún efecto en el crecimiento a las concentraciones que se usaron. Aunque las tres sales de acetato también tuvieron un impacto negativo en el crecimiento de AcR#3 (Fig. 6B) la inhibición con esta cepa no fue tan dramática cuando la concentración de acetato fue

sólo 8 g/L. Tomados en conjunto, los experimentos que se muestran en las Figuras 5 y 6 proporcionan una evidencia inequívoca de que AcR#3 es mucho más resistente al acetato que la cepa parental, ZW801-4.

AcR#3 se comporta mejor en una mezcla con una concentración alta de azúcar más acetato que ZW801-4

5 Cuando AcR#3 se ensayó bajo las mismas condiciones experimentales que se usaron para la "población mixta" de mutantes (Figura 4B), superó a ZW801-4 y hubo una diferencia mucho mayor entre los dos cultivos que la que hubo en el experimento anterior (Figura 7). Conforme con los resultados previos, la mejora sólo fue evidente durante la última etapa de la fermentación después de que se hubo consumido toda la glucosa y la xilosa era la única fuente de carbono restante. De hecho, una inspección cuidadosa de los cursos de tiempo que se muestran en la Figura 7 reveló que las velocidades iniciales de la utilización de la glucosa y la producción de etanol eran ligeramente más lentas para AcR#3.

10 Sin embargo, después de que se agotara toda la glucosa, es evidente a partir de las pendientes de las curvas de utilización de la xilosa que AcR#3 era capaz de convertir este azúcar en etanol a una velocidad mayor que ZW801-4 durante la última etapa de la fermentación.

15 El potencial completo de AcR#3 no podría evaluarse en el experimento descrito anteriormente ya que incluso la cepa control era capaz de usar todo el azúcar al finalizar el experimento bajo las condiciones empleadas. Para eliminar esta limitación, AcR#3 y ZW801-4 se ensayaron de nuevo usando condiciones más exigentes. La temperatura se elevó de 30°C a 33°C y se usó una concentración mayor de glucosa y xilosa. Los cultivos de siembra se crecieron a 30°C en medio SM hasta una  $DO_{600}$  de ~4,4 y se usó un inóculo al 10% para empezar los biorreactores. Los cultivos finales de 150 ml contenían medio mRM3S más 126 g/L de glucosa, 107 g/L de xilosa y 10 g/L de acetato. El agitador se ajustó a 150 rpm y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 33°C, respectivamente. Este experimento se realizó en triplicado para ZW801-4 y en duplicado para AcR#3 y los valores de punto final (puntos de tiempo a 67 hr) para glucosa, xilosa, acetato y etanol (Media  $\pm$  SE) se proporcionan en la Tabla 1. El análisis por HPLC del caldo de fermentación fue como se ha descrito en el Ejemplo 2 y las concentraciones de todos los compuestos en la tabla son en g/L. Bajo estas condiciones más duras AcR#3 consumió ~10% más de xilosa y produjo ~4% más de etanol que la cepa parental, ZW801-4.

25 Tabla 1. Valores de punto final para xilosa, etanol y xilitol en fermentadores con el pH controlado con las cepas ZW801-4 y AcR#3 crecidas en altas concentraciones de azúcar y acetato.

Cepa	Glucosa	Xilosa	Acetato	Etanol
ZW801-4	0	27,1 $\pm$ 1,4	10,8 $\pm$ 0,1	90,3 $\pm$ 0,3
AcR#3	0	18,7 $\pm$ 0,4	10,8 $\pm$ 0,1	93,8 $\pm$ 0,2

AcR#3 se comporta mejor que ZW801-4 en 100% Hidrolizado Simulado

30 Los comportamientos de AcR#3 y ZW801-4 se evaluaron en presencia de concentraciones de iones amonio y acetato que se espera que estén presentes en el hidrolizado de biomasa producido usando un proceso de pretratamiento con hidróxido de amonio. Éste fue un experimento crítico ya que se ha estimado que la concentración de iones amonio durante la fermentación de hidrolizado de forraje de maíz pretratado con hidróxido de amonio puede superar 180 mM y altas concentraciones de iones amonio inhiben el crecimiento de *Z. mobilis* (Agrawal (1989) Biotechnology and Bioengineering 34: 278-281). El medio sintético 100% Hidrolizado Simulado (100% MH) que se usó para estos experimentos contiene 5 g/L de extracto de levadura, 15 mM de  $(NH_4)_2HPO_4$ , 160 mM de acetato de amonio, 1 g/L de  $MgSO_4$  y 10 mM de sorbitol (pH 5,8). Así, las concentraciones finales de iones acetato y amonio en 100% MH después de la adición de los cultivos de siembra era ~9,5 g/L y 190 mM, respectivamente. Los experimentos se realizaron en biorreactores con el pH controlado. Los cultivos de siembra se crecieron a 30°C en medio SM hasta una  $DO_{600}$  de ~4,4 y se usó un inóculo al 10% para empezar los biorreactores. Los cultivos finales de 150 ml contenían 100% MH más 110 g/L de glucosa y 90 g/L de xilosa. El agitador se ajustó a 150 rpm y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 33°C, respectivamente. A varios tiempos, se tomaron alicuotas para análisis por HPLC del caldo de fermentación usando el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 2. Los resultados de un par representativo de experimentos que se realizaron al mismo tiempo se muestran en la Figura 8: ZW801-4 en 8A y AcR#3 en 8B.

45 Conforme con las observaciones previas, la cepa AcR#3 no tenía una velocidad incrementada de producción de etanol cuando la glucosa era el único azúcar que se estaba metabolizando. Sin embargo, el comportamiento superior de AcR#3 fue muy evidente durante la última etapa de la fermentación cuando la xilosa era la única fuente de carbono restante. Cuando ZW801-4 hubo consumido toda la glucosa, la concentración de etanol era ya >65 g/L, que es una concentración bactericida incluso para *Z. mobilis*. Además de este entorno duro estaban las altas concentraciones de iones acetato y amonio, que potencian los dos la toxicidad del etanol. Como el nivel de etanol continuó elevándose, el metabolismo de la

xilosa se volvió cada vez más lento y eventualmente se interrumpió. El mismo escenario ocurrió con AcR#3 pero el periodo de tiempo se extendió. Debido a que AcR#3 es más resistente al acetato fue capaz de sobrevivir más tiempo en el entorno tóxico y, por lo tanto, fue capaz de consumir virtualmente toda la xilosa del medio de crecimiento y producir más etanol que ZW801-4.

- 5 El experimento con 100% MH se repitió dos veces más para ambas cepas y los resultados fueron virtualmente idénticos. Un análisis estadístico de los tres experimentos se proporciona en la Tabla 2 usando valores de punto final (punto de tiempo 48 hr) para glucosa, xilosa, acetato y etanol; todas las concentraciones son en g/L (Media  $\pm$  SE). Cada uno de los seis biorreactores se inoculó con un cultivo de siembra crecido de manera independiente. En 100% MH, AcR#3 consumió ~14 g/L más xilosa que ZW801-4 y esto incrementó la titulación final de etanol de 82 g/L hasta 91 g/L, que es más de un 10% de incremento. Estos resultados son incluso más dramáticos que los obtenidos en los experimentos con altas concentraciones de azúcar más acetato proporcionados en la Tabla 1. Cuando los iones amonio están presentes en el medio de crecimiento con acetato, el nivel de estrés se eleva hasta un nivel incluso mayor y los beneficios de la inactivación del gen *himA* se vuelven más obvios. Claramente, una cepa como AcR#3 que tiene una mayor tolerancia para el acetato está mejor equipada para lidiar con los demás inhibidores en su entorno, como etanol y iones amonio.
- 10
- 15 Tabla 2. Valores de punto final para glucosa, xilosa, etanol y acetato en fermentadores con el pH controlado con las cepas ZW801-4 y AcR#3 crecidas en 100% Hidrolizado Simulado.

Cepa	Glucosa	Xilosa	Acetato	Etanol
ZW801-4	0	15,6 $\pm$ 3,9	11,5 $\pm$ 0,5	81,9 $\pm$ 2,8
AcR#3	0	1,0 $\pm$ 0,2	10,7 $\pm$ 0,4	91,3 $\pm$ 0,7

#### Ejemplo 5

##### Generación de una construcción suicida para la inactivación del gen *himA* en ZW801-4

- 20 Aunque los resultados presentados hasta aquí sugieren fuertemente que el fenotipo resistente al acetato de AcR#3 resultó de la interrupción del gen *himA*, dos factores más podrían haber contribuido potencialmente. Como se ha descrito en el Ejemplo 1, el transposón que se usó para generar la biblioteca genómica de inactivación/sobreexpresión de ZW801-4 contenía un casete Spec<sup>f</sup> y el promotor Pgap de *Z. mobilis*. Estos elementos están orientados en direcciones opuestas y ambos se insertaron en el marco de lectura abierto de *himA* durante la transposición. Como el promotor Pgap de *Z. mobilis* es un promotor fuerte, constitutivo podría haber alterado el nivel de expresión de genes que están muy próximos al sitio de inserción del transposón en *himA*. También es concebible que al menos parte del fenotipo resistente al acetato de AcR#3 resultara de mutaciones espontáneas en otros genes que también pueden haber permitido un crecimiento más rápido durante el proceso de enriquecimiento de mutantes de la biblioteca (Ejemplo 2). Para descartar estas posibilidades y ver si la inactivación del gen *himA* es la única responsable de la mayor tolerancia al acetato de AcR#3, diseñamos una construcción suicida para inactivar el gen *himA* en ZW801-4. Este plásmido no replicativo tiene un casete de resistencia a espectinomicina pero no contiene un promotor Pgap como se describe con más detalle a continuación.
- 25
- 30

- La construcción suicida que se usó en la presente invención para inactivar el gen *himA* en ZW801-4 ("pHimA") se obtuvo finalmente de otra construcción suicida ("pLDHSp-9WW") que se usó previamente para inactivar por inserción el gen de la D-lactato deshidrogenasa en *Z. mobilis* usando recombinación homóloga mediada por el anfitrión de entrecruzamiento doble y resistencia a espectinomicina como marcador seleccionable. pLDHSp-9WW también se obtuvo a partir de varias construcciones que se generaron previamente. El precursor inicial de todas estas construcciones fue el vector plasmídico pNEB193 (New England Biolabs #N3051S) que está disponible comercialmente. Este plásmido se eligió porque puede replicarse en *E. coli* pero no puede replicarse en *Z. mobilis*. Todas las etapas e intermedios que estaban implicados en la generación de la construcción con inactivación de *himA* se describen a continuación en orden cronológico empezando con el plásmido pNEB193.
- 35
- 40

##### Construcción de pLDH193

- pNEB193 se digirió doblemente con SbfI y Ascl para la inserción del fragmento de ADN que se describe a continuación. Los dos sitios de restricción son únicos y están localizados en la región de multiclonación del plásmido. El fragmento de ADN del plásmido pNEB193 linealizado con SbfI/Ascl se purificó usando el Kit de Purificación QIAQuick de Qiagen (catálogo #28104) según el protocolo del fabricante. El inserto de ADN que se clonó en pNEB193 fue un fragmento de 2268 pb que se amplificó por PCR del ADN genómico de *Z. mobilis* que se aisló de la cepa ZW1 (ATCC #31821) usando el Maxi Kit Blood & Cell Culture de Qiagen (catálogo #13362). Los oligonucleótidos sintéticos que se usaron para la amplificación por PCR de este fragmento fueron los Cebadores 1 y 2.
- 45

Cebador 1 (SEQ ID NO:4)

CTACTCATTtctgcaggTGGTAACTCATTGCGCGCTC

Cebador 2 (SEQ ID NO:5)

CATCTTACTggcgcgccAAAAATCTGCGGCTGACATAC

- 5 Las bases subrayadas del Cebador 1 (cebador directo) hibridan con los nucleótidos 1262739-1262720 del genoma de *Z. mobilis* (número de registro de GenBank AE008692) en el extremo 3' del marco de lectura abierto que codifica la fosfogliceromutasa (pgm), mientras que las letras en minúsculas corresponden a un sitio SbfI que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas del Cebador 2 (cebador inverso) hibridan con los nucleótidos 1260490-1260472 del genoma de *Z. mobilis* que está justo en el extremo 5' del marco de lectura abierto que codifica la alcohol deshidrogenasa I (adhI), mientras que las letras en minúsculas corresponden a un sitio Ascl que se añadió al extremo 5' del cebador. El fragmento de ADN de 2268 pb que se eligió como diana para la amplificación por PCR consiste, por lo tanto, en los elementos siguientes empezando desde el sitio SbfI y terminando en el sitio Ascl: (a) el extremo 3' del gen pgm, (b) el gen ldh completo que codifica la D-lactato deshidrogenasa, y (c) una región 5' no traducida del gen adhI. El producto de PCR se cortó con SbfI y Ascl y el fragmento de ADN resultante se ligó en el vector pNEB193 linealizado con SbfI/Ascl que se ha descrito anteriormente. La mezcla de reacción de ligación se usó para transformar *E. coli* JM110 y las células transformadas se plaquearon en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml). Los transformantes resistentes a ampicilina que contenían plásmidos con el inserto del tamaño correcto se identificaron inicialmente por PCR usando colonias resuspendidas ("PCR de colonias") y los Cebadores 1 y 2. La confirmación posterior de los clones positivos se obtuvo a partir de análisis de digestión por restricción del ADN plasmídico con SbfI y Ascl y el análisis de la secuencia de ADN del fragmento de 2268 pb que se generó por PCR de colonias con los transformantes resistentes a ampicilina. El plásmido que se seleccionó para manipulaciones adicionales se denominó pLDH193.

Construcción de pLDHTc139#7

- 25 El plásmido pLDH193 tiene un único sitio NcoI que está localizado aproximadamente en la mitad del marco de lectura abierto de ldh. Este sitio se usó para insertar un fragmento de ADN que confiere resistencia a tetraciclina. El casete de resistencia a tetraciclina (casete Tc<sup>r</sup>) que se usó para esta manipulación se generó por PCR usando el plásmido pACYC184 (número de registro de GenBank X06403) como un molde de ADN y los Cebadores 3 y 4 como cebadores de PCR.

Cebador 3 (SEQ ID NO:6):

ACTCATTtccatggCGATCGCACTATgcgccgcAATGTAGCACCTGAAGTCAGCC

30 Cebador 4 (SEQ ID NO:7):

ATCTCACTccatggCCGGCCAACATAttaattaaGAATTGATTGGCTCCAATTCTTG

- 35 Las bases subrayadas en negrita del Cebador 3 (cebador directo) hibridan justo en el extremo 5' del promotor para el gen de resistencia a tetraciclina. El Cebador 3 también tiene tres sitios de restricción (NcoI, AsiSI y NotI) que se añadieron a su extremo 5'. El sitio NcoI está en letras minúsculas normales. El sitio AsiSI está subrayado con una línea fina. El sitio NotI está en letras minúsculas en itálica. Las bases subrayadas en negrita del Cebador 4 (cebador inverso) hibridan justo en el extremo 3' del codón de parada para el gen de resistencia a tetraciclina y este cebador también tiene tres sitios de restricción (NcoI, FseI y PaeI) que se añadieron a su extremo 5'. De manera similar al marcaje anterior, el sitio NcoI está en letras minúsculas normales, el sitio FseI está subrayado con una línea fina y el sitio PaeI está en letras minúsculas en itálica. El casete Tc<sup>r</sup> de 1448 pb que se generó con los Cebadores 3 y 4 se cortó con NcoI y se purificó por electroforesis preparativa en gel de agarosa. El fragmento de ADN resultante se ligó en el único sitio NcoI que está presente en el marco de lectura abierto de ldh del plásmido, pLDH193. Para minimizar la posibilidad de recircularización del vector sin un inserto, el pNEB193 digerido con NcoI se desfosforiló con fosfatasa alcalina intestinal de ternera antes de la ligación. La mezcla de reacción de ligación se introdujo en *Escherichia coli* JM110 y las células transformadas se plaquearon en medio LB que contenía 20 µg/ml de tetraciclina. Los transformantes resistentes a tetraciclina que contenían los plásmidos con el inserto correcto se identificaron por análisis de digestión por restricción con NcoI, AsiSI, NotI, FseI y PaeI y la orientación del casete Tc<sup>r</sup> se confirmó por análisis por PCR usando los cebadores apropiados. En la Figura 9A se muestra un diagrama circular del plásmido que se seleccionó para manipulaciones adicionales (denominado pLDHTc139#7). En otro proyecto, la construcción suicida se usó con éxito para la inactivación por inserción (para "interrumpir" o "inactivar") del gen de la D-lactato deshidrogenasa en ZW1 usando recombinación homóloga mediada por el anfitrión con entrecruzamiento doble y crecimiento en tetraciclina como marcador seleccionable.

Construcción de pLDHTc139#7-9WW

Habiendo demostrado que pLDHTc139#7 podría usarse para "inactivar" el gen de la D-lactato deshidrogenasa en ZW1, la construcción se modificó de manera que sería posible eliminar el marcador seleccionable del cromosoma después de la interrupción génica, usando recombinasa Cre. Para lograr este objetivo, se añadieron dos sitios loxP de tipo salvaje (Lee y Salto, 1998) a pLDHTc139#7 aprovechando los cuatro sitios de restricción únicos que flanquean el casete Tc<sup>r</sup>, concretamente AsiSI y NotI en el extremo 5' y PacI y FseI en el extremo 3'. El primer sitio loxP se insertó entre los sitios AsiSI y NotI del plásmido pLDHTc139#7 después de cortar la construcción con ambas enzimas y purificar el fragmento de ADN grande resultante. El sitio loxP que se insertó en esta localización se generó a partir de dos oligonucleótidos sintéticos (Oligos 5 y 6) que estaban fosforilados los dos en su extremo 5'.

Oligo 5 (SEQ ID NO:8):

5 cgcATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATgc

Oligo 6 (SEQ ID NO:9):

ggccgcATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATgcat

15 Los Oligos 5 y 6 son complementarios entre sí y cuando se hibridan entre sí forman un sitio loxP de longitud completa, bicatenario de tipo salvaje que tiene protuberancias monocatenarias en ambos extremos, lo que permite ligar el fragmento de ADN entre los sitios AsiSI y NotI de pLDHTc139#7. Las letras en mayúsculas en los Oligos 5 y 6 corresponden al sitio loxP de longitud completa de tipo salvaje, mientras que las letras en minúsculas indican los nucleótidos que se usaron para ligar el fragmento de ADN bicatenario en los sitios AsiSI y NotI de pLDHTc139#7.

20 La mezcla de reacción de ligación se usó para transformar *Escherichia coli* DH10B y las células transformadas se plaquearon en medio LB que contenía 20 µg/ml de tetraciclina. Los transformantes resistentes a tetraciclina que contenían los plásmidos con el sitio loxP insertado correctamente en los sitios AsiSI y NotI de pLDHTc139#7 se identificaron por análisis de digestión por restricción, PCR de colonias usando los cebadores apropiados y análisis de secuencia de ADN de las regiones relevantes. El plásmido que se seleccionó para manipulaciones adicionales se denominó pLDHTc139#7-9W.

25 A continuación, se insertó un segundo sitio loxP de tipo salvaje entre los sitios PacI y FseI en el otro extremo del casete Tc<sup>r</sup> en pLDHTc139#7-9W, después de cortar el plásmido con ambas enzimas y purificar el fragmento del vector grande resultante. El sitio loxP que se insertó en esta localización también se generó con dos oligonucleótidos sintéticos (Oligos 7 y 8) que estaban fosforilados los dos en su extremo 5'.

Oligo 7 (SEQ ID NO:10):

taaATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATggccgg

30 Oligo 8 (SEQ ID NO:11):

ccATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATtaat

35 Los Oligos 7 y 8 son complementarios entre sí y cuando se hibridan entre sí forman un sitio loxP de longitud completa, bicatenario de tipo salvaje que tiene protuberancias monocatenarias en ambos extremos, lo que permite ligar el fragmento de ADN entre los sitios PacI y FseI de pLDHTc139#7-9W. Las letras en mayúsculas en los Oligos 7 y 8 corresponden al sitio loxP de longitud completa y las letras en minúsculas indican los nucleótidos que se usaron para ligar el fragmento de ADN bicatenario en los sitios PacI y FseI de pLDHTc139#7-9W.

40 La mezcla de reacción de ligación se usó para transformar *Escherichia coli* DH10B y las células transformadas se plaquearon en medio LB que contenía 20 µg/ml de tetraciclina. Los transformantes resistentes a tetraciclina que contenían los plásmidos con el sitio loxP de tipo salvaje insertado correctamente en los sitios PacI y FseI de pLDHTc139#7-9W se identificaron por análisis de digestión por restricción, PCR de colonias usando los cebadores apropiados y análisis de secuencia de ADN de las regiones relevantes. El plásmido que se seleccionó para manipulaciones adicionales se denominó pLDHTc139#7-9WW y en la Figura 9B se muestra un diagrama circular de esta construcción.

Construcción de pLDHSp-9WW

45 pLDHSp-9WW es idéntico a pLDHTc139#7-9WW, excepto en que el casete de resistencia a tetraciclina en la última construcción se reemplazó por un fragmento de ADN que confiere resistencia a espectinomicina (es decir, un casete Spec<sup>r</sup>). El último se generó por PCR usando el plásmido pHP15578 (descrito en Cahoon et al, 2003) como molde y los Cebadores 9 y 10 para la amplificación por PCR. pHP15578 contiene la secuencia de nucleótidos completa para el

casete Spec<sup>f</sup>, incluyendo su promotor, que está basada en la secuencia publicada del gen *aadA* en el Transposón Tn7 (número de registro de GenBank X03403) que codifica la 3' (9)-O-nucleotidiltransferasa.

Cebador 9 (SEQ ID NO:12):

ATAAAAGcggccgcAGCACAGGATGA

5 Cebador 10 (SEQ ID NO:13):

GGCGttaattaaGGCAGGTCAGCAAG

Las bases subrayadas del Cebador 9 (cebador directo) hibridan justo en el extremo 5' del promotor para el casete Spec<sup>f</sup> (en los nt 6-17 del número de registro de GenBank X03043), mientras que las letras en minúsculas corresponden a un sitio NotI que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas del Cebador 10 (cebador inverso) hibridan aproximadamente 130 bases del extremo 3' del codón de parada del casete Spec<sup>f</sup> (en los nt 1006-1019 del número de registro de GenBank X03043), mientras que las letras en minúsculas corresponden a un sitio PaeI que se añadió al extremo 5' del cebador. El casete Spec<sup>f</sup> de 1040 pb generado por PCR se digirió doblemente con NotI y PaeI y el fragmento de ADN resultante se purificó por electroforesis en gel de agarosa. El plásmido pLDHTc139#7-9WW también se cortó con las mismas dos enzimas de restricción para eliminar el casete Tc<sup>r</sup> y el fragmento de vector grande resultante se purificó por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de PCR y de vector se ligaron entre sí y la mezcla de reacción de transformación se introdujo en *E. coli* DH10B usando electroporación. Los transformantes se plaquearon en medio LB que contenía espectinomicina (200 µg/ml) y se crecieron a 37°C. Los transformantes resistentes a espectinomicina que contenían los plásmidos con el inserto de tamaño apropiado se identificaron por análisis de digestión por restricción con NotI y PaeI y el plásmido que se seleccionó para manipulaciones adicionales se denominó pLDHSp-9WW; en la Figura 9C se muestra un diagrama circular de esta construcción.

En otro proyecto, pLDHSp-9WW se usó para inactivar el gen de la D-lactato deshidrogenasa en ZW1 usando recombinación homóloga mediada por el anfitrión de entrecruzamiento doble y crecimiento en espectinomicina como selección. El evento de entrecruzamiento doble se dirigió al gen *ldh* por dos fragmentos de ADN que flanquean el casete Spec<sup>f</sup> en la construcción suicida. Unos de estos fragmentos (referido a continuación como ADN que flanquea *ldh* en 5') está justo en el extremo 5' del casete Spec<sup>f</sup> y está localizado entre los sitios SbfI y AsiSI. La secuencia de nucleótidos de este fragmento de ADN de ~1100 pb es idéntica al ADN cromosómico de ZW1 que codifica el extremo 3' del gen *pgm* y aproximadamente la primera mitad del marco de lectura abierto de *ldh*. El otro fragmento de ADN (referido a continuación como ADN que flanquea *ldh* en 3') está localizado en el extremo opuesto del casete Spec<sup>f</sup> entre los sitios FseI y Ascl. La secuencia de nucleótidos del ADN que flanquea *ldh* en 3' (que también tiene ~1100 pb) es idéntica al ADN cromosómico que codifica la otra mitad del gen *ldh* y parte de la región no traducida en 5' del gen *adhI*. Ocurre un evento de entrecruzamiento doble cuando los fragmentos de ADN que flanquean *ldh* en 5' y 3' interaccionan ambos con sus equivalentes cromosómicos y sufren recombinación homóloga. Este fenómeno, que es esencialmente irreversible y completamente mediado por la maquinaria enzimática del anfitrión, inactiva el gen *ldh* cromosómico por la inserción del casete Spec<sup>f</sup> que está flanqueado por dos sitios loxP de tipo salvaje en la mitad del marco de lectura abierto. Como la construcción suicida no puede replicarse en *Z. mobilis*, la única manera de generar colonias resistentes a espectinomicina estables con pLDHSp-9WW (aparte de mutantes resistentes al fármaco espontáneos que aparecen con una frecuencia muy baja) es un evento de entrecruzamiento doble a través de recombinación homóloga.

Construcción de pHimA

40 Para generar una construcción de inactivación del gen *himA*, el ADN que flanquea *ldh* en pLDHSp-9WW se reemplazó por ADN que flanquea *himA* para dirigir el marcador seleccionable y el evento de entrecruzamiento doble al gen cromosómico *himA*. Se requirieron cuatro fragmentos de ADN para esta manipulación como se describe a continuación.

El Fragmento 1 se obtuvo a partir de pLDHSp-9WW (Fig. 9C) cortando el plásmido con cuatro enzimas de restricción diferentes: NotI, BsaI, SbfI y Ascl. NotI corta pLDHSp-9WW en el nt 2647 y BsaI corta el plásmido en el nt 1816. Después de que el ADN plasmídico se digirió completamente con las cuatro enzimas de restricción, el fragmento de ADN de 2666 pb de SbfI-Ascl se purificó por electroforesis usando un gel de agarosa al 1% y el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean (catálogo #D4001, Zymo Research). Este fragmento, denominado Fragmento 1, contiene un origen de replicación de *E. coli* que no es funcional en *Z. mobilis* y un gen que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

50 El Fragmento 2 también se obtuvo a partir de pLDHSp-9WW. El plásmido se digirió doblemente con FseI y AsiSI y el fragmento de ADN de 1105 pb FseI-AsiSI resultante se purificó por electroforesis usando un gel de agarosa al 1% y el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean (catálogo #D4001, Zymo Research) para limpiar el fragmento. Este fragmento, denominado Fragmento 2, contiene el casete Spec<sup>f</sup> que está flanqueado por dos sitios loxP de tipo salvaje, uno a cada extremo.

El Fragmento 3 contiene ADN que flanquea *himA* en 3'. El Fragmento 3 de ~1,12 Kpb se generó por PCR usando los Cebadores A y B. El molde para la amplificación por PCR fue ADN genómico que se aisló de ZW658 (ATCC #PTA-7858) usando el Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard (catálogo #A1125, Promega).

Cebador A (SEQ ID NO:14):

5 CTACTCATcctgcaggTTTAATGAATGAGCGGATGCTG

Cebador B (SEQ ID NO:15):

CATCTTACTgcgatcgcTGACTTTCCGTGCCAGCCAG

10 Las bases subrayadas del Cebador A (cebador directo) hibridan con los nucleótidos 1137154-1137175 del genoma de *Z. mobilis* (número de registro de GenBank AE008692) que están localizados en la mitad de una región codificadora de un supuesto miembro de la familia de proteínas glutatión S-transferasa (Seo et al., Nat. Biotechnol. 23(1), 63-68 (2005)) que está en el extremo 3' del gen *himA*, mientras que las letras en minúsculas corresponden a un sitio SbfI que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas del Cebador B (cebador inverso) hibridan con los nucleótidos 1138276-1138257 del genoma de *Z. mobilis* en el extremo 3' del marco de lectura abierto de *himA*, mientras que las letras en minúsculas corresponden a un sitio AsiSI que se añadió al extremo 5' del cebador. Los sitios de unión cromosómicos para los Cebadores A y B y el producto de PCR que se genera (Fragmento 3) se muestran en la Figura 10A. El producto de PCR se digirió con SbfI y AsiSI y el fragmento de 1123 pb resultante se purificó por electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito anteriormente.

20 El Fragmento 4 contiene el ADN que flanquea *himA* en 5'. El Fragmento 4 de ~1,16 kb se generó por PCR usando los Cebadores C y D. El molde para la amplificación por PCR fue ADN genómico que se aisló de ZW658 (ATCC #PTA-7858) usando el Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard (catálogo #A1125, Promega).

Cebador C (SEQ ID NO:16):

TCACTCATggccggccGGGATATCAGCTTGCATGCTC

Cebador D (SEQ ID NO:17):

CATCTTACTggcgcgccGATATGCTGCCTTCCGAAGTG

25 Las bases subrayadas del Cebador C (cebador directo) hibridan con los nucleótidos 1138510-1138530 del genoma de *Z. mobilis* en el extremo 5' del marco de lectura abierto de *himA*, mientras que las letras en minúsculas corresponden a un sitio FseI que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas del Cebador D (cebador inverso) hibridan con los nucleótidos 1139668-1139648 del genoma de *Z. mobilis* en el extremo 3' del gen *himA* en el extremo 3' de un gen que presumiblemente codifica un regulador de respuesta de dos componentes (Seo et al., Nat. Biotechnol. 23(1), 63-68 (2005)), mientras que las letras en minúsculas corresponden a un sitio Ascl que se añadió al extremo 5' del cebador. Los sitios de unión cromosómicos para los Cebadores C y D y el producto de PCR que se genera (Fragmento 4) se muestran en la Figura 10A. El producto de PCR se digirió con FseI y Ascl y el fragmento de 1159 pb resultante se purificó por electroforesis usando un gel de agarosa al 1%.

35 Los cuatro fragmentos de ADN descritos anteriormente se sometieron a una reacción de ligación de 4 vías para ensamblar la construcción de inactivación de *himA*, pHimA mostrado en la Figura 10B. La relación molar de los Fragmentos 1-4 que se usó para esta reacción fue aproximadamente 1:1:1:1. Una alícuota de la mezcla de reacción de ligación se electroporó en *E. coli* DH10B y las células transformadas se plaquearon en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml); las placas se incubaron a 37°C. Los transformantes con resistencia doble a ampicilina y espectinomicina que contenían los plásmidos con los insertos de tamaño correcto se identificaron inicialmente por PCR de colonias usando dos pares diferentes de cebadores: Cebador A/Cebador B y Cebador C/Cebador D. La confirmación posterior de los clones positivos se hizo por análisis de digestión por restricción del ADN plasmídico con SbfI y Ascl y análisis de secuencia de ADN del ADN plasmídico de pHimA de los clones positivos de PCR.

45 Para obtener ADN plasmídico no metilado necesario para la transformación de *Z. mobilis*, pHimA se introdujo en *E. coli* SCS110 (dcm<sup>-</sup>, dam<sup>-</sup>) y las células transformadas se plaquearon en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml); el crecimiento fue a 37°C. Las células químicamente competentes que se usaron para esta manipulación se obtuvieron de Stratagene (No. de Cat. 200247) y se siguió el protocolo del distribuidor. Es importante indicar que el uso de ADN plasmídico no metilado para la transformación de las cepas de *Z. mobilis* que se obtienen de ZM4 es crítico para lograr el éxito, ya que el ADN plasmídico metilado que se aísla a partir de cepas de *E. coli* de tipo salvaje, como DH10B, es destruido fácilmente por el sistema de restricción/modificación del anfitrión. En la última etapa,

50

el ADN plasmídico se aisló de uno de los transformantes SCS110 usando el Kit Plasmid Maxi de QIAGEN (No. de Cat. 12162) y la concentración final de ADN fue  $\sim 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### Ejemplo 6

##### Generación del mutante con *himA* inactivado ZW801-4

5 Para inactivar el gen *himA* en ZW801-4, el ADN plasmídico de pHimA no metilado (que no se replica en *Z. mobilis*) se introdujo en ZW801-4 usando electroporación, esencialmente como se describe en EEUU 5.514.583. Brevemente, las reacciones de transformación de 50  $\mu\text{l}$  contenían  $\sim 10^{10}$  células/ml en glicerol al 10% (v/v) y  $\sim 0,5 \mu\text{g}$  de ADN plasmídico no metilado que se aisló de *E. coli* SSC110 como se ha descrito en el Ejemplo 5. La reacción control se trató de manera idéntica, pero no recibió ningún ADN plasmídico. Los ajustes para el electroporador fueron 1,6 kv/cm, 200  $\Omega$  y 25  $\mu\text{f}$  y el ancho de la cubeta fue 0,1 cm. Después de la electroporación, las reacciones de transformación se diluyeron con 1,0 ml de medio MMG (50 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ) y se permitió que las células se recuperaran durante  $\sim 3$  horas a  $30^\circ\text{C}$ . Las células se recogieron por centrifugación a temperatura ambiente (13.000 x g, 5 min) en tubos de microfuga estériles de 1,5 ml y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de medio líquido MMG y se plaquearon alícuotas de 25, 50 y 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular en medio MMG que contenía 1,5% agar y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de espectinomicina. Las placas se incubaron en una cámara anaeróbica a  $30^\circ\text{C}$  y después de 48-72 horas había al menos 100 colonias en todas las placas experimentales. Por el contrario, la reacción control sólo rindió una colonia que estaba en la placa que recibió 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular. Dos de las colonias resistentes a espectinomicina que resultaron de la transformación con la construcción de inactivación pHimA se seleccionaron para manipulaciones adicionales como se describe a continuación.

Los experimentos previos en nuestro laboratorio con *Z. mobilis* y construcciones suicidas que son análogas a pHimA han revelado que la interacción inicial entre el cromosoma y el ADN plasmídico es un evento de entrecruzamiento simple que tiene lugar en una de las dos secuencias de ADN que flanquean y que estos eventos de entrecruzamiento simple dan lugar eventualmente a eventos de entrecruzamiento doble. La transición al evento de entrecruzamiento doble es normalmente muy rápida y ocurre habitualmente después de unas pocas transferencias seriadas en medio líquido o sólido que contiene el agente selectivo para la construcción suicida, en este caso espectinomicina. Para facilitar el evento de entrecruzamiento doble para la presente invención y descartar la posibilidad de obtener una "población mezclada" de eventos de entrecruzamiento simple y doble, los dos transformantes principales que se han descrito anteriormente se sembraron en una placa de MMG que contenía 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de espectinomicina. Después de un periodo de incubación de 30 hr a  $33^\circ\text{C}$  bajo condiciones anaeróbicas, se aislaron colonias separadas de ambas siembras sembrando en estrías las células en placas de agar frescas que contenían el mismo medio de crecimiento. Después de un periodo de incubación de 30 hr a  $33^\circ\text{C}$  bajo condiciones anaeróbicas, se sembró una colonia de cada uno de los transformantes principales originales en una placa de MMG fresca que contenía espectinomicina (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y estas dos cepas se caracterizaron adicionalmente como se describe a continuación.

La confirmación de que realmente ocurrió el evento de entrecruzamiento doble y de que cada cepa que se aisló consistía en una población homogénea de células se obtuvo de los experimentos de PCR de colonias usando tres pares diferentes de cebadores. El primer par de cebadores, GTTCTGCGCCTGTTATTCTG (SEQ ID NO:18) y CTACCTCTGATAGTTGAGTCG (SEQ ID NO:19) sólo podría generar un producto de PCR del tamaño correcto si el ADN que flanquea *himA* en 5' en la construcción suicida había sufrido un evento de entrecruzamiento simple con su equivalente cromosómico. De manera similar, el segundo par de cebadores, GATATTCCAGTGCTGATCGAC (SEQ ID NO:20) y CTACGTGAAAGGCGAGATCAC (SEQ ID NO:21), sólo podría generar un producto de PCR del tamaño correcto si el ADN que flanquea *himA* en 3' en la construcción suicida había sufrido un evento de entrecruzamiento simple con su equivalente cromosómico. Finalmente, el tercer par de cebadores, GATCAGGTAGGTGTGCTCTA (SEQ ID NO:22) y GCATCAGAGAGCATACTGCT (SEQ ID NO:23), sólo podría generar un producto de PCR del tamaño correcto si había ocurrido un evento de entrecruzamiento doble en el locus correcto. Este par de cebadores también fue capaz de detectar cantidades traza de copias no interrumpidas del gen *himA* y/o eventos de entrecruzamiento simple si también estaban presentes como contaminantes. Como los dos mutantes con *himA* inactivado que se examinaron rindieron los resultados esperados con tres conjuntos diferentes de cebadores y aparecieron indistinguibles, sólo uno de ellos se seleccionó para una caracterización adicional. Esta cepa se refiere a continuación como "Z801-4:: $\Delta\text{himA}$ ".

#### Ejemplo 7

##### La inactivación del gen *himA* es la única responsable del fenotipo AcR#3

En la Fig. 11 se muestra una comparación directa de ZW801-4 y ZW801-4:: $\Delta\text{himA}$  en MH 100% usando biorreactores con pH controlado. Los cultivos de siembra se crecieron a  $30^\circ\text{C}$  en medio SM hasta una  $\text{DO}_{600}$  de  $\sim 4,4$  y los biorreactores se empezaron con un inóculo del 10%. Los cultivos finales de 150 ml contenían MH 100% más 110 g/L de

5 glucosa y 90 g/L de xilosa. El agitador se ajustó a 150 rpm y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 33°C, respectivamente. A diferentes tiempos, se tomaron alicuotas de los biorreactores para análisis por HPLC del caldo de fermentación usando el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 2. Obsérvese que éstas son exactamente las mismas condiciones experimentales que se usaron para los experimentos con AcR#3 y ZW801-4 que se muestran en la Figura 8 y la Tabla 2 (Ejemplo 4).

10 Los resultados proporcionados en la Figura 11 muestran que ZW801-4::ΔhimA (Figura 11B) se comportó mucho mejor que ZW801-4 (Figura 11A) en MH 100%. A las 48 horas había usado toda la glucosa y xilosa en el medio de crecimiento y había generado ~90 g/L de etanol. Por el contrario, la cepa parental, ZW801-4, no usó todo el azúcar y todavía había ~17 g/L de xilosa residual en el caldo de fermentación al final del experimento. La titulación final de etanol para ZW801-4 también fue significativamente menor (81 g/L). Así, la inactivación del gen *himA* resultó en un incremento de aproximadamente el 10% en la producción de etanol bajo condiciones relevantes para el proceso, que es virtualmente idéntico a los resultados que se obtuvieron con AcR#3 usando las mismas condiciones experimentales. Aunque estos resultados sugieren fuertemente que AcR#3 y ZW801-4::ΔhimA son cepas equivalentes, era importante ensayar su comportamiento en un experimento comparativo. Para esta comparación también se usó MH 100% pero las concentraciones iniciales de glucosa y xilosa se incrementaron ambas un ~10%, ya que ambas cepas fueron capaces de usar todo el azúcar en los experimentos anteriores.

20 Los cultivos de siembra se crecieron a 30°C en medio SM hasta una DO<sub>600</sub> de 4,5 y los biorreactores se empezaron con un inóculo del 10%. Los cultivos finales de 150 ml contenían MH 100% más 118 g/L de glucosa y 98 g/L de xilosa. El agitador se ajustó a 150 rpm y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 33°C, respectivamente. A diferentes tiempos, se tomaron alicuotas de los biorreactores para análisis por HPLC del caldo de fermentación usando el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 2. Los valores finales para glucosa, xilosa, acetato, producción de etanol y biomasa (DO<sub>600</sub>) para ambas cepas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de punto final para glucosa, xilosa, etanol y acetato en fermentadores con el pH controlado con las cepas ZW801-4::ΔhimA y AcR#3 crecidas en Hidrolizado Simulado 100% con altas concentraciones de azúcar.

Cepa	Horas	DO <sub>600</sub>	Glucosa	Xilosa	Acetato	Etanol
ZW801-4::ΔhimA	0	0,48	118,2	98,4	10,0	3,9
ZW801-4::ΔhimA	70	6,3	0	14	10,5	90,7
AcR#3	0	0,48	118,0	98,2	10,0	4,0
AcR#3	70	6,2	0	14,1	10,4	90,6

25 Los resultados de este experimento demuestran que la inactivación del gen *himA* es la única responsable del comportamiento mejorado de fermentación, ya que tanto ZW801-4::ΔhimA como AcR#3 se comportaron de manera idéntica en el sistema de ensayo. Estas dos cepas también fueron indistinguibles cuando se ensayaron para la resistencia al acetato (Figura 12) usando las mismas condiciones que se usaron para el experimento que se muestra en la Figura 5. Claramente, el promotor Pgap integrado en el gen *himA* de AcR#3 y el proceso de enriquecimiento de mutantes prolongado al que se sometió esta cepa tuvieron poco o ningún efecto en el fenotipo *himA* deseable.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110>
- <120> ZYMOMONAS CON UNA PRODUCCIÓN MEJORADA DE ETANOL EN MEDIO QUE CONTIENE AZÚCARES CONCENTRADOS Y ACETATO
- 5 <130> CL4041PCT
- <160> 26
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 342
- 10 <212> ADN
- <213> Zymomonas mobilis
- <400> 1
- |  |     |
|--|-----|
| atgaataaac gctatgataa cgcacaaac ggacagagca tgcaagctga tatcccaact   | 60  |
| ttgacccgcg ccgatattac cgacatgctt taccatgaag taggtttgtc gcgggcagat  | 120 |
| tccgccaaga tgatcgaaca aatgcttggg cacattacag atgccctgaa aaaagggtgaa | 180 |
| aatgtcaaaa tatctggttt tggcagcttt attctcaggg ataaaaatga acgtgttggc  | 240 |
| cgtaatccta aaacagggat cgaggttcct atcgcaccaa ggccgggttct gactttccgt | 300 |
| gccagccagt tgatgcgcca gcggattatc aaggggagcct aa                    | 342 |
- <210> 2
- 15 <211> 27
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador
- 20 <400> 2
- |                               |    |
|-------------------------------|----|
| gtgaaaggcg agatcaccaa ggtagtc | 27 |
|-------------------------------|----|
- <210> 3
- <211> 30
- <212> ADN
- 25 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador
- <400> 3

	<b>ctacctctga tagttgagtc gatacttcgg</b>	<b>30</b>
	<210> 4	
	<211> 38	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 4	
	<b>ctactcattt cctgcaggtg gtaactcatt gcgcgctc</b>	<b>38</b>
10	<210> 5	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> CATCTTACTggcgcgccAAAAATCTGCGGCTGACATAC	
	<400> 5	
	<b>catcttactg gcgcgcaaaa aatctgcggc tgacatac</b>	<b>38</b>
	<210> 6	
	<211> 56	
20	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 6	
25	<b>actcatttcc atggcgatcg cactatgcgg ccgcaatgta gcacctgaag tcagcc</b>	<b>56</b>
	<210> 7	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 7	

	<b>atctcactcc atggccggcc aactattaat taagaatiga ttggctccaa ttcttg</b>	<b>56</b>
	<210> 8	
	<211> 39	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligo sintético	
	<400> 8	
	<b>cgcataactt cgtataatgt atgctatag aagttatgc</b>	<b>39</b>
10	<210> 9	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> oligo sintético	
	<400> 9	
	<b>ggccgcataa cttcgtatag catacattat acgaagttat gcgat</b>	<b>45</b>
	<210> 10	
	<211> 43	
20	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligo sintético	
	<400> 10	
25	<b>taaataactt cgtataatgt atgctatag aagttatggc cgg</b>	<b>43</b>
	<210> 11	
	<211> 41	
	<212> ADN	
30	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligo sintético	
	<400> 11	

	<b>ccataacttc gtatagcata cattatacga agttatttaa t</b>	<b>41</b>
	<210> 12	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 12	
	<b>ataaaaagcgg ccgcagcaca ggatga</b>	<b>26</b>
10	<210> 13	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 13	
	<b>ggcgttaatt aaggcaggtc agcaag</b>	<b>26</b>
	<210> 14	
	<211> 38	
20	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 14	
25	<b>ctactcatcc tgcaggttta atgaatgagc ggatgctg</b>	<b>38</b>
	<210> 15	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 15	
	<b>catcttactg cgatecgtga ctttccgtgc cagccag</b>	<b>37</b>

	<210> 16	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 16	
	<b>tcactcatgg ccggccggga ttcagcttg catgctc</b>	<b>37</b>
	<210> 17	
10	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
15	<400> 17	
	<b>catcttactg gcgcgccgat atgctgcctt ccgaagtg</b>	<b>38</b>
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 18	
	<b>gttctgcgcc tggtattctg</b>	<b>20</b>
25	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 19	
	<b>ctacctctga tagttgagtc g</b>	<b>21</b>
	<210> 20	

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> cebador  
 <400> 20  
**gatattccag tgctgatcga c** **2:**  
 <210> 21  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 21  
 15 **ctacgtgaaa ggcgagatca c** **21**  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 22  
**gatcaggtag gtgtgctcta** **20**  
 <210> 23  
 25 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 23  
**gcatcagaga gcatactgct** **20**  
 <210> 24  
 <211> 1302

<212> ADN

<213> Zymomonas mobilis

<400> 24

```

atgacgaaca aaatctcgtc ttcagataat ctttccaatg ctgtttcagc aacggatgac      60
aacgcttccc gtacgccaaa tctgaccctg cgcgctctcg ttggtggtgg tgttgactg      120
gccgcagctg gcgccttagc cagtggctct caggcagcga cgcttcctgc tggtgccagc      180
caggttccga ccacgcctgc aggtcgcccg atgccttacg cgatccgccg gatgccggaa      240
gatcgtcgtt tcggttatgc tatcgtcggg ctgggtaaat atgcccttaa ccagatttta      300
ccgggttttg ccggatgcca gcattcccgc atcgaagctt tggtcagcgg taacgctgaa      360
aaagctaaaa tcgttgccgc tgaatatggc gtcgatcccc gtaaaattta tgattacagc      420
aacttcgaca agatcgctaa agatccaaaa atcgacgctg tttacatcat ttgccaac      480
tctttgcatg ctgaatttgc tatccgtgct tcaaagccg gcaagcatgt tatgtgtgaa      540
aagccgatgg caacctctgt tgctgattgt cagcggatga tcgatgcagc caaggctgct      600
aataaaaagc tgatgatcgg ttaccgttgc cactatgatc caatgaaccg tgcagcggta      660
aaattgatcc gtgaaaacca gttgggtaaa ctgggcatgg ttaccaccga caactcagac      720
gttatggatc agaacgatcc tgcacagcag tggcgtctgc gtcgtgaact cgccggtggc      780
ggttctttga tggatatcgg tatttatggc ttgaacggta cccgttactt gctgggtgaa      840
gaaccgatcg aagtccgtgc ttacacctac agcgatccga atgatgaacg tttcgttgaa      900
gtcgaagatc gtattatttg gcagatgcgc ttcagaagcg gtgctctgtc tcatggtgca      960
tcttcttatt cgaccacgac gacttcacgt ttctcgggtc agggcgacaa agctgttctg    1020
ttgatggatc cggctaccgg atattatcag aatttgattt ctgtccagac cccaggccat    1080
gctaaccagt cgatgatgcc acagttcadc atgccagcga acaaccagtt ctctgcacag    1140
ttggatcadc tggctgaagc cgtcatcaat aacaaaccag ttcgtagccc ggggtgaagaa    1200
ggtatgcagg atgtgcgctt gattcagggc atttatgaag cagctcgtac cggtcgcccc    1260
5  gtcaacacgg attgggggta tgctcgtcag ggtgggttatt ga                        1302

```

<210> 25

<211> 1287

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> región codificadora de GFOR con inserción y delección

<400> 25

```

atgacgaaca aaatctcgtc ttcagataat ctttccaatg ctgtttcagc aacggatgac      60
aacgcttccc gtacgccaaa tctgacccgt cgcgctctcg ttggtggtgg tgttggactg      120
gccgcagctg gcgccttagc cagtggctct caggcagcga cgcttcctgc tggtgccagc      180
caggttccga ccacgcctgc aggtcgcccc atgccttacg cgatccgccc gatgccggaa      240
gatcgtcgtt tcggttatgc tatcgtcggg ctgggtaa atgcccctta ccagatttta      300
ccgggttttg ccggaigcca gcattcccgc atcgaagctt tggtcagcgg taacgctgaa      360
aaagctaaaa tcggtgccgc tgaatatggc gtcgatcccc gtaaaattta tgattacagc      420
aacttcgaca agatcgctaa agatccaaaa atcgacgctg tttacatcat tttgccaaac      480
tctttgcatg ctgaatttgc tatccgtgct ttcaaagccg gcaagcatgt tatgtgtgaa      540
aagccgatgg caacctctgt tgctgattgt cagcggatga tcgatgcagc caaggctgct      600
aataaaaagc tgatgatcgg ttaccgttgc cactatgatc caatgcaccg tgcagcgatc      660
gcataacttc gtataatgta tgctatacga agttatggta ctcatggccg gcctcagaac      720
gatcctgcac agcagtggcg tctgcgtcgt gaactcgccg gtggcggttc tttgatggat      780
atcggatatt atggcttgaa cggtaacctg tacttgctgg gtgaagaacc gatcgaagtc      840
cgtgcttaca cctacagcga tccgaatgat gaacgtttcg ttgaagtcga agatcgtatt      900
at ttggcaga tgcgcttcag aagcgggtgct ctgtctcatg gtgcatcttc ttattcgacc      960
acgacgactt cacgtttctc ggtgcagggc gacaaagetg ttctgttgat ggatccggct      1020
accggatatt atcagaattt gatttctgct cagaccccag gccatgctaa ccagtcgatg      1080
atgccacagt tcatcatgcc agcgaacaac cagttctctg cacagttgga tcatctggct      1140
gaagccgtca tcaataacaa accagttcgt agcccgggtg aagaaggtat gcaggatgtg      1200
cgctgatc aggccattta tgaagcagct cgtaccggtc gccccgtcaa cacggattgg      1260
ggttatgtcc gtcaggggtg ttattga      1287

```

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Zymomonas mobilis

<400> 26

Met Asn Lys Arg Tyr Asp Asn Arg Thr Asn Gly Gln Ser Met Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Ile Pro Thr Leu Thr Arg Ala Asp Ile Thr Asp Met Leu Tyr His  
 20 25 30  
 Glu Val Gly Leu Ser Arg Ala Asp Ser Ala Lys Met Ile Glu Gln Met  
 35 40 45  
 Leu Gly His Ile Thr Asp Ala Leu Lys Lys Gly Glu Asn Val Lys Ile  
 50 55 60  
 Ser Gly Phe Gly Ser Phe Ile Leu Arg Asp Lys Asn Glu Arg Val Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Asn Pro Lys Thr Gly Ile Glu Val Pro Ile Ala Pro Arg Arg Val  
 85 90 95  
 Leu Thr Phe Arg Ala Ser Gln Leu Met Arg Gln Arg Ile Ile Lys Gly  
 100 105 110

Ala

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir etanol a partir de un medio con mezcla de azúcares que comprende xilosa, que comprende:
- 5 (a) proporcionar una cepa de *Zymomonas* recombinante capaz de utilizar xilosa para producir etanol, comprendiendo dicha cepa al menos una modificación genética en el gen *himA* que reduce la expresión de la proteína de la subunidad alfa del factor de integración del anfitrión (HimA); y
- (b) cultivar la cepa de (a) en un medio que comprende xilosa, en el que dicha cepa usa la xilosa como fuente de carbono para producir etanol.
- 10 2. El proceso según la Reivindicación 1, en el que el cultivo se hace en un intervalo de temperatura de desde aproximadamente 25<sup>0</sup>C hasta aproximadamente 40<sup>0</sup>C en medio con pH en un intervalo que es entre aproximadamente 4,5 y 7,5.
3. El proceso según la Reivindicación 2, en el que la temperatura es entre aproximadamente 30<sup>0</sup>C y 37<sup>0</sup>C.
4. El proceso según la Reivindicación 2, en el que el pH es entre aproximadamente 5,8 y 7,0.
5. El proceso según la Reivindicación 1, en el que la modificación genética es una modificación del gen *himA* seleccionada del grupo que consiste en inserción, delección, mutación, cosupresión y expresión de ARN antisentido.
- 15 6. El proceso según la Reivindicación 5, en el que la modificación genética hace que el gen *himA* no sea funcional.
7. El proceso según la Reivindicación 6, en el que la modificación genética es una inserción introducida en el gen *himA* por recombinación homóloga.
8. El proceso según la Reivindicación 1, en el que la cepa recombinante de *Zymomonas* es ZW801-4:: $\Delta$ himA o la cepa AcR#3.
- 20 9. El proceso según la Reivindicación 1, en el que el medio comprende además acetato y en el que la cepa recombinante de *Zymomonas* produce una cantidad incrementada de etanol comparada con su cepa parental de *Zymomonas* sin modificación genética que reduce la expresión de *himA*.
10. El proceso de la Reivindicación 9, en el que dicha cantidad incrementada de etanol producida se debe a la resistencia al acetato de la cepa de *Zymomonas*.
- 25 11. El proceso de la Reivindicación 9, en el que el medio comprende al menos aproximadamente 120 g/L de mezcla de azúcares que comprende xilosa, un alcohol de azúcar seleccionado del grupo que consiste en sorbitol, manitol, galactitol, ribitol y una mezcla de éstos en una concentración final que es entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 100 mM y al menos aproximadamente 6 g/L de acetato.
- 30 12. El proceso de la Reivindicación 11, en el que el alcohol de azúcar está en una concentración que es entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 20 mM.

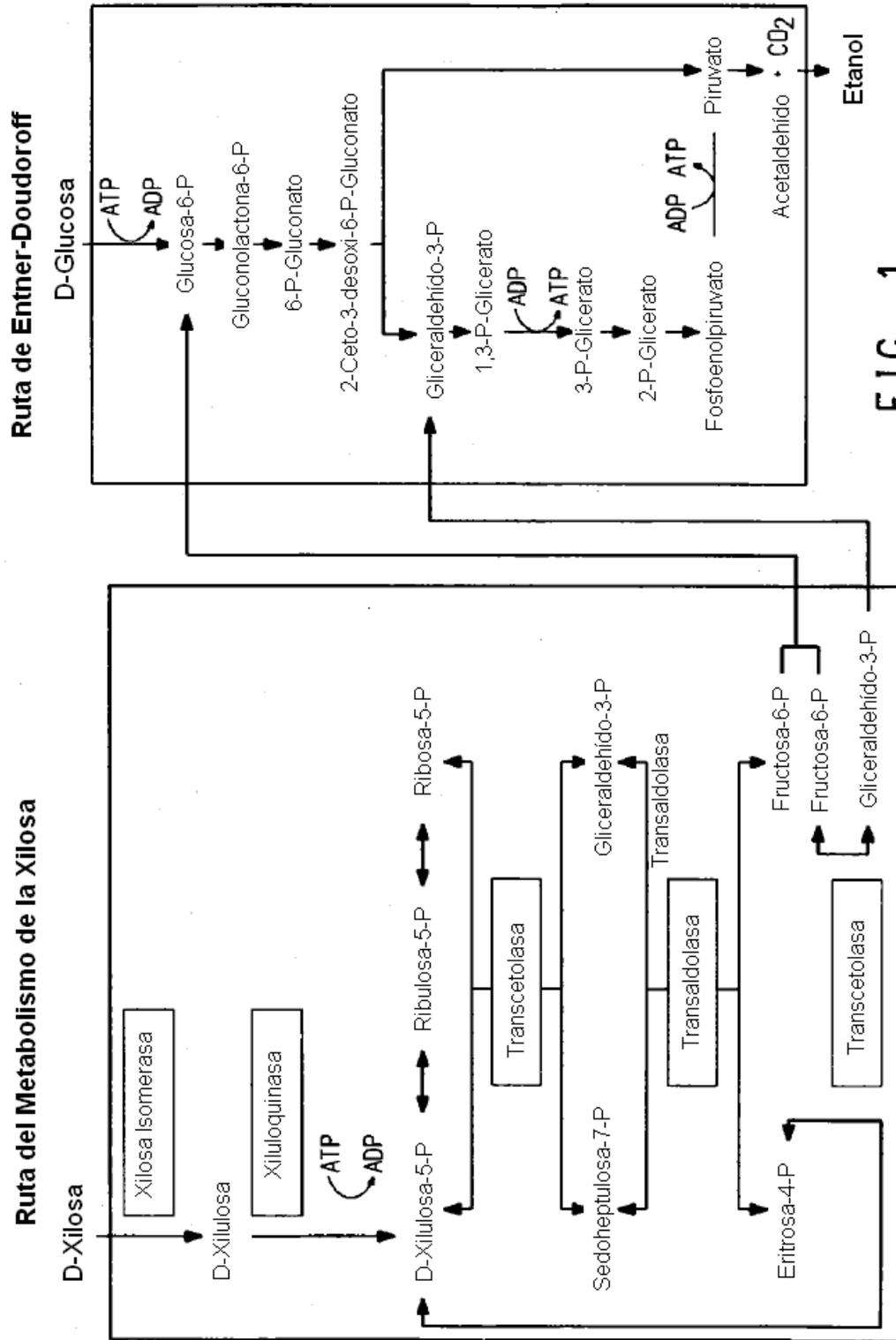


FIG. 1

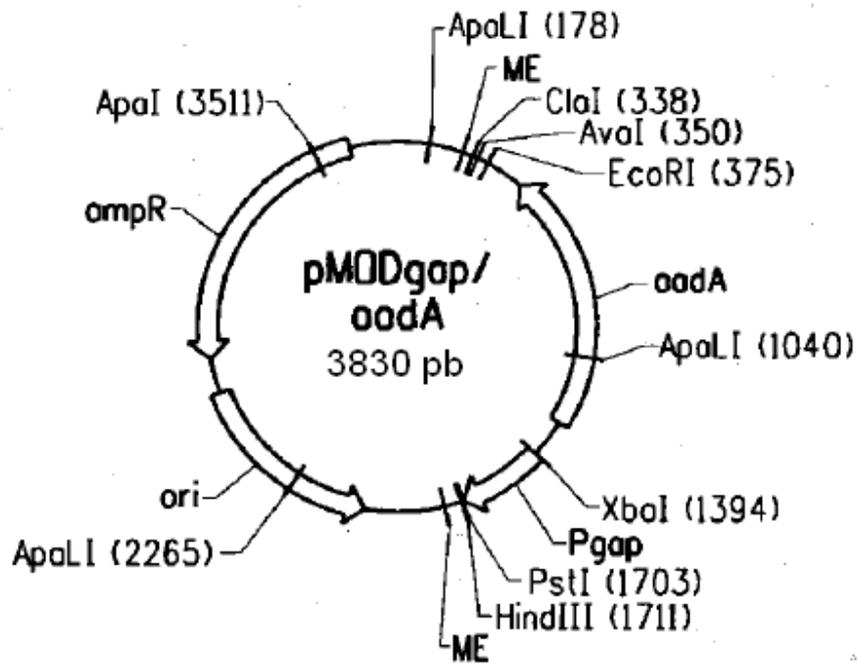


FIG. 2

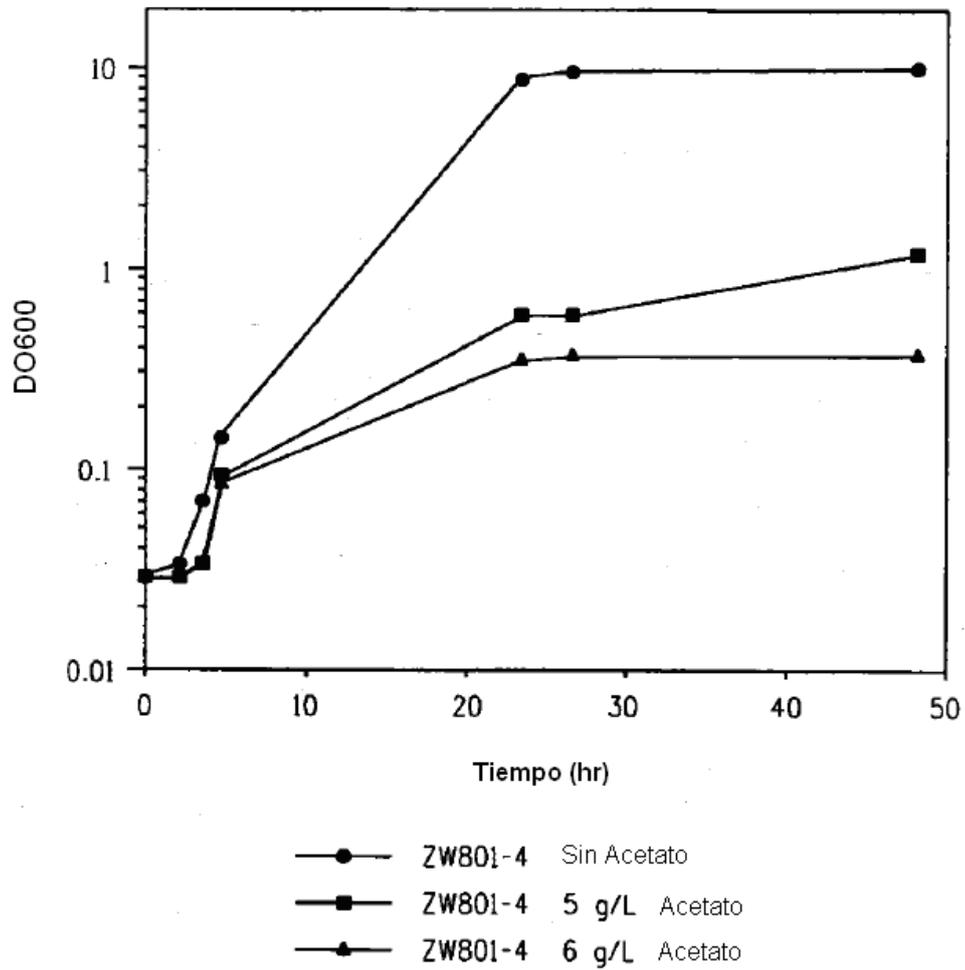


FIG. 3

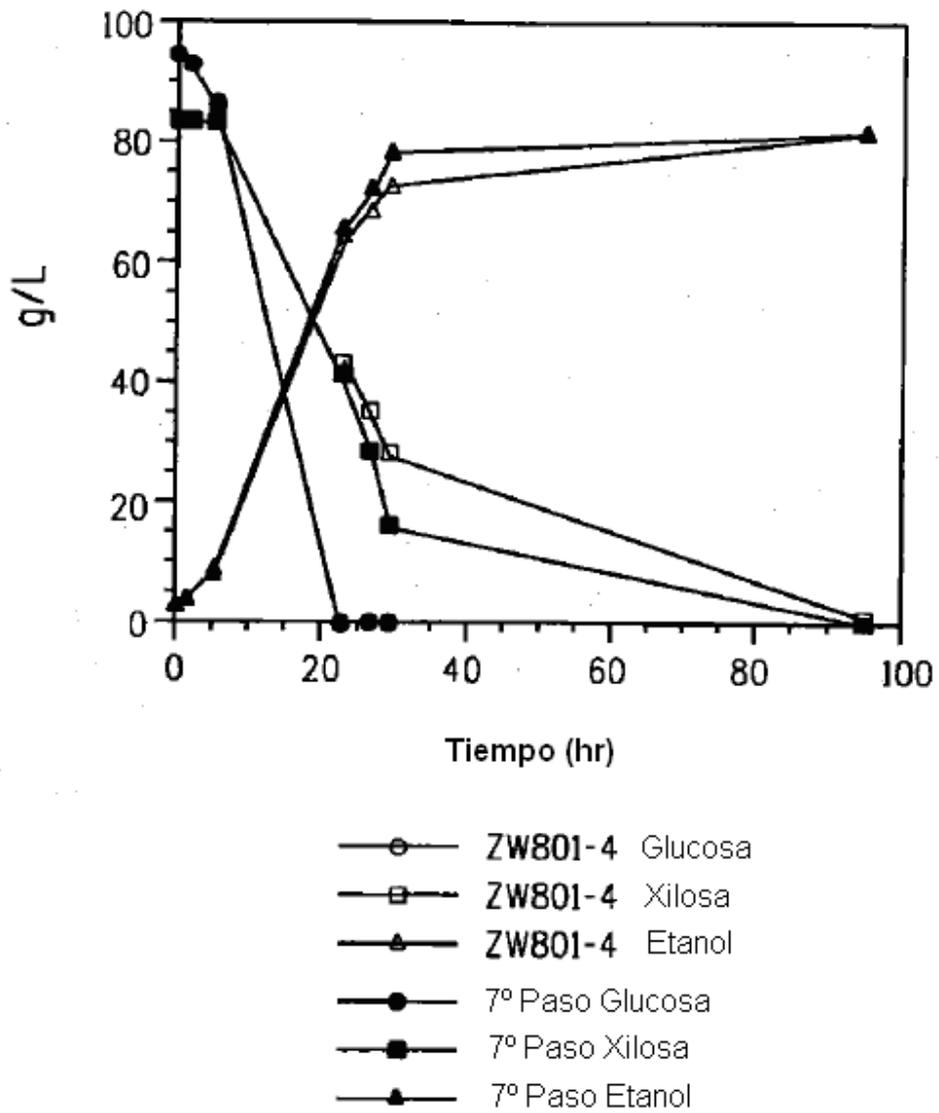


FIG. 4A

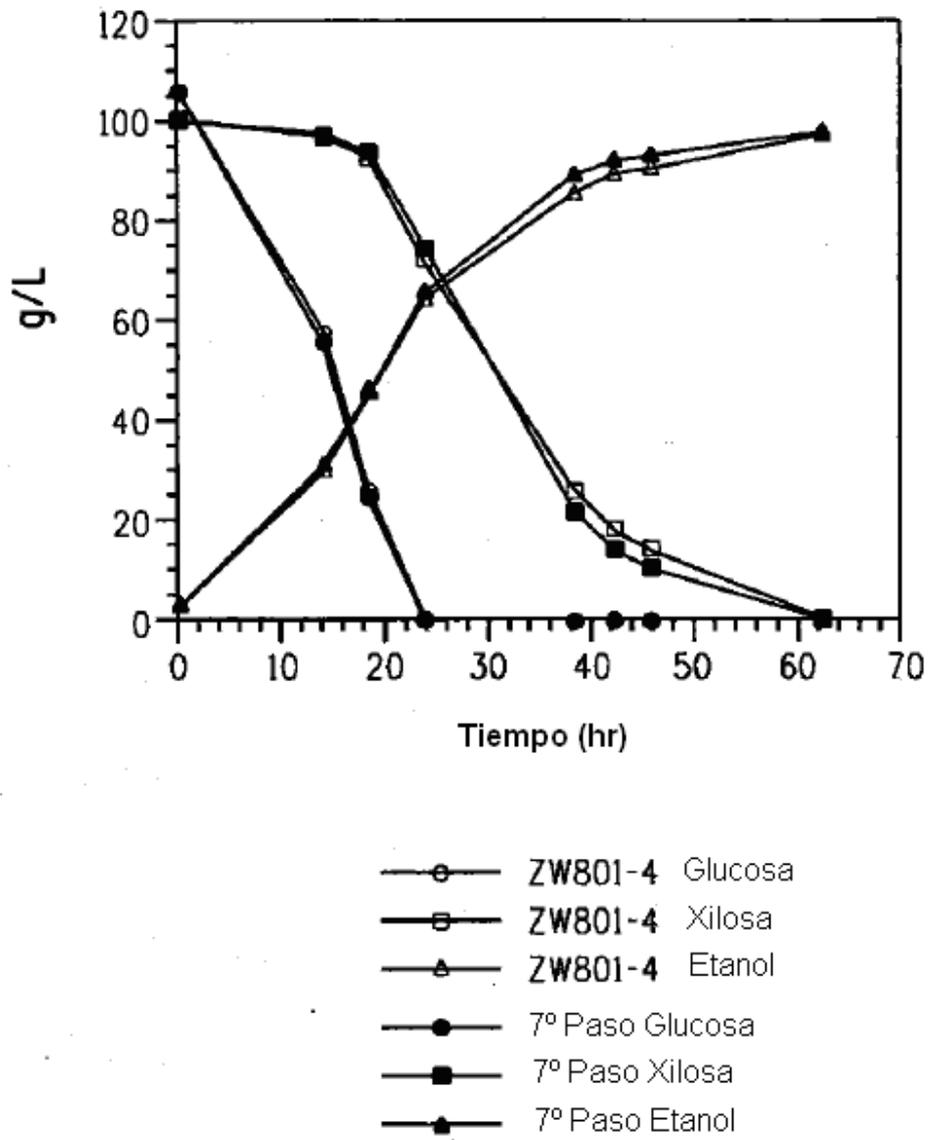


FIG. 4B

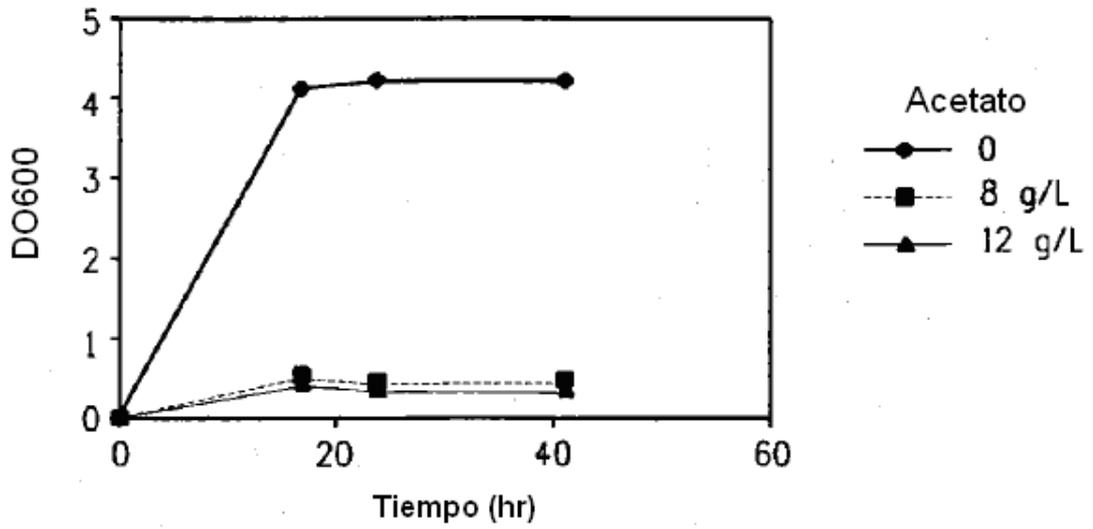


FIG. 5A

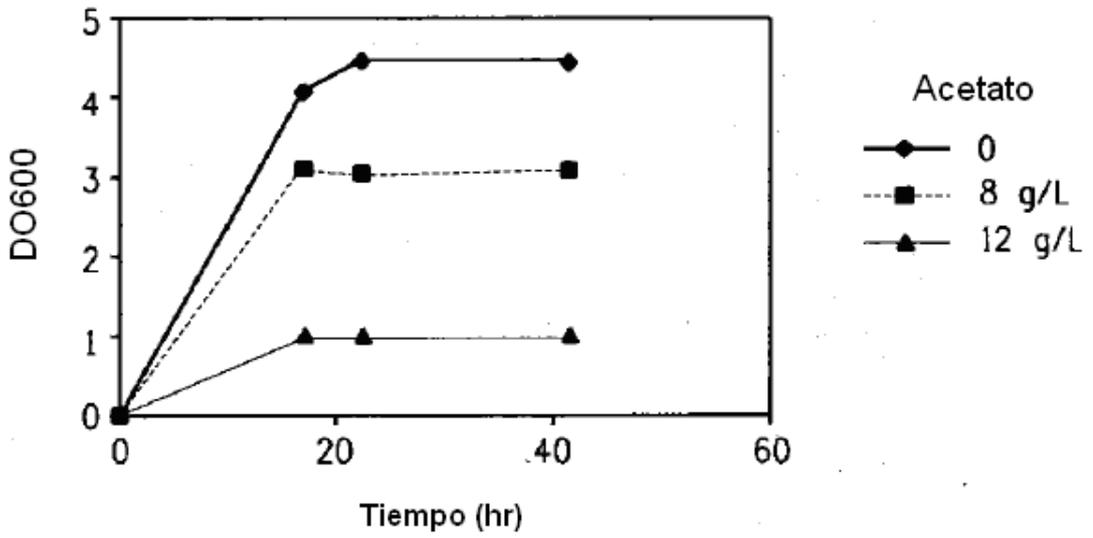


FIG. 5B

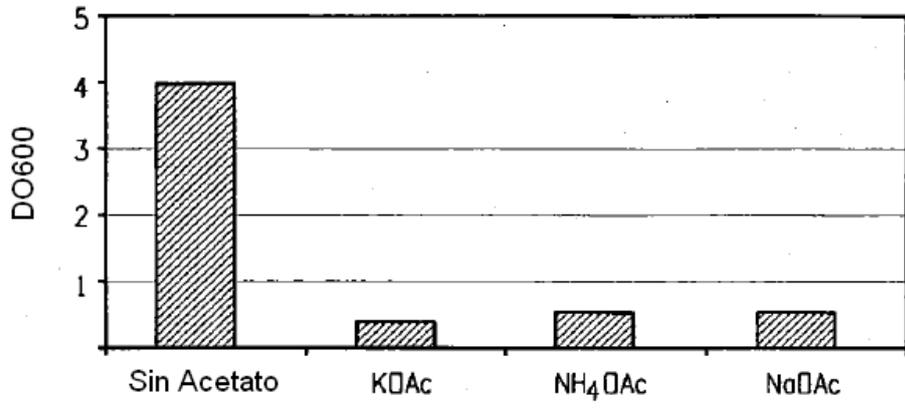


FIG. 6A

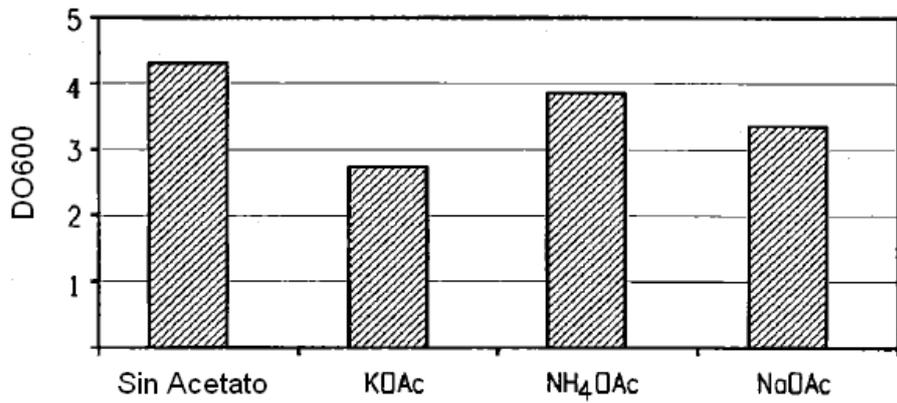


FIG. 6B

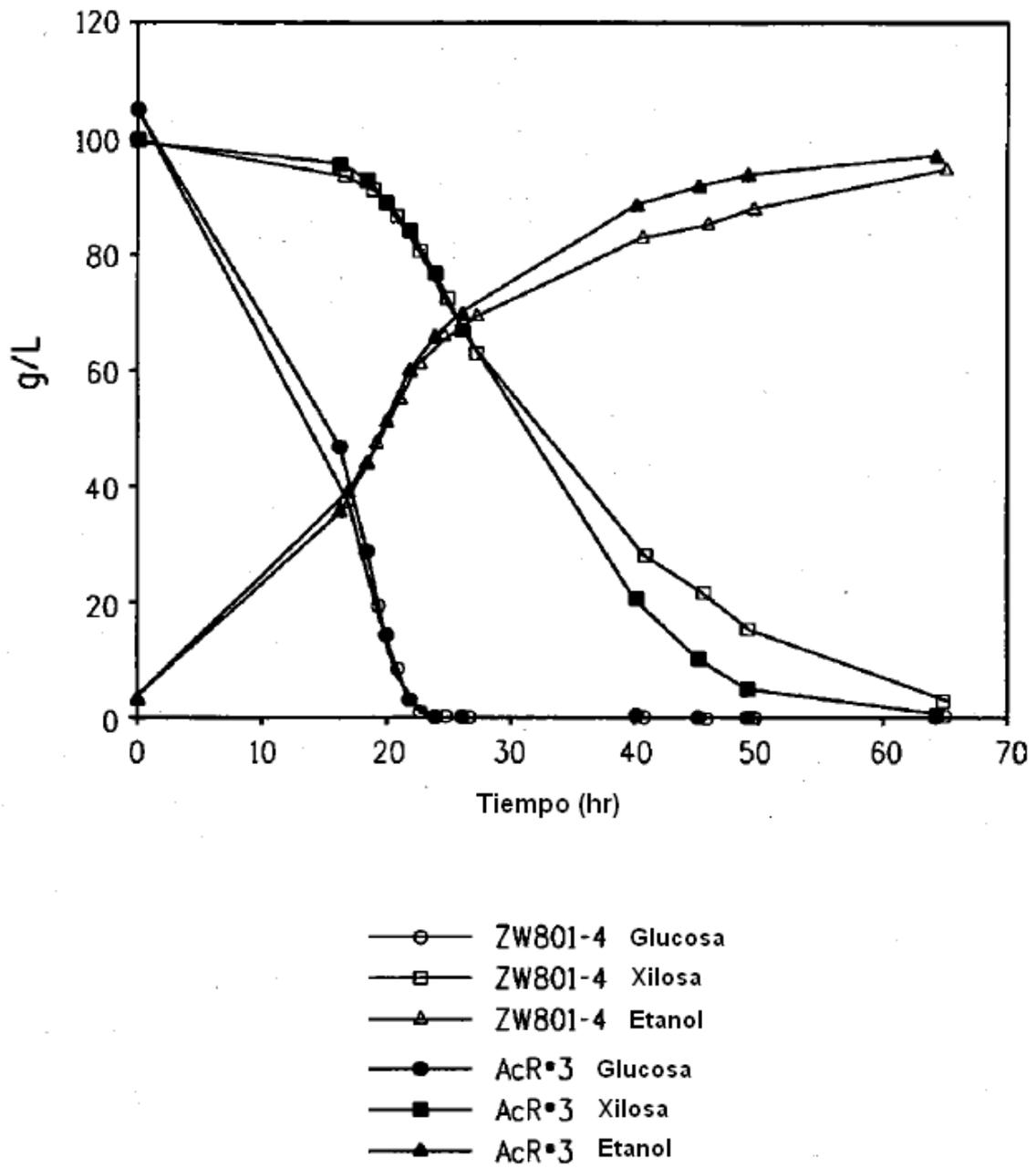


FIG. 7

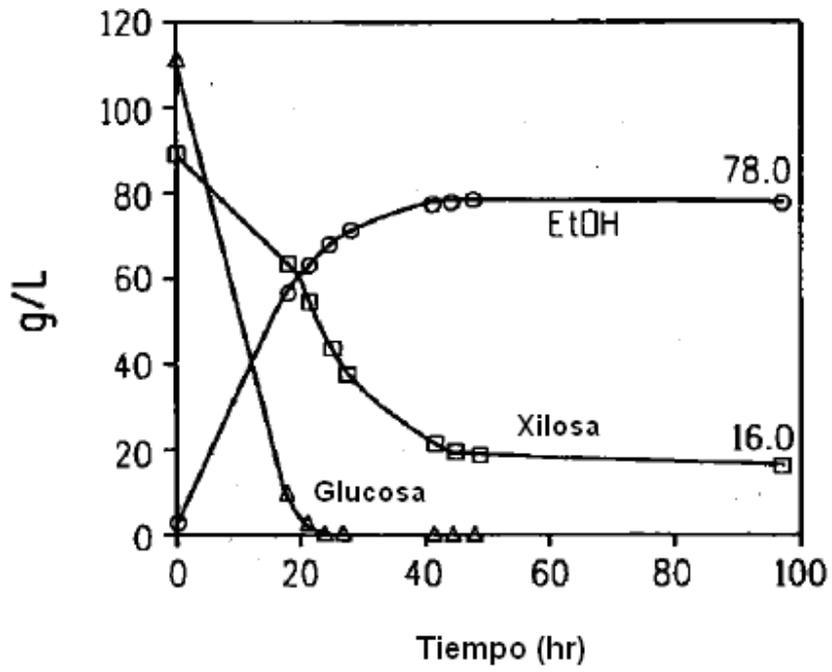


FIG. 8A

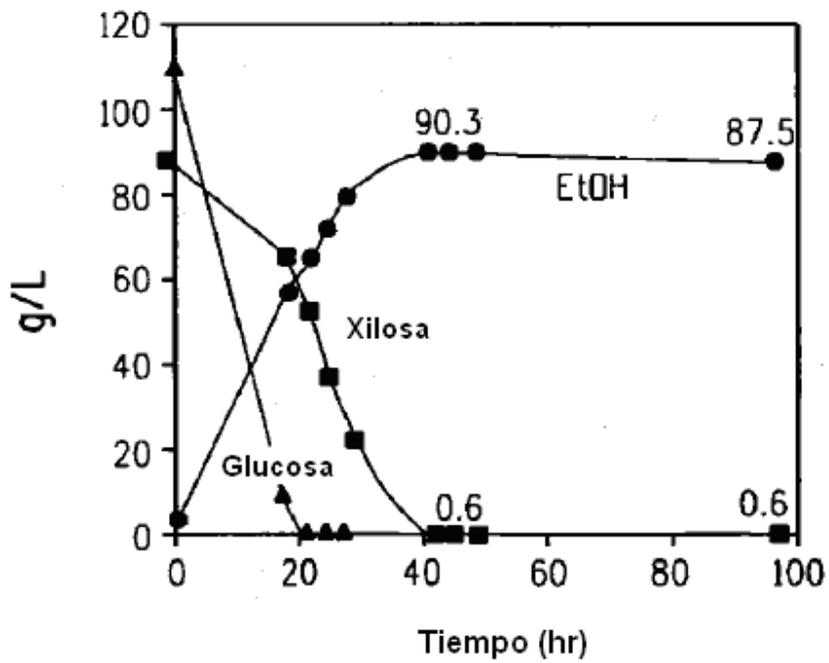


FIG. 8B

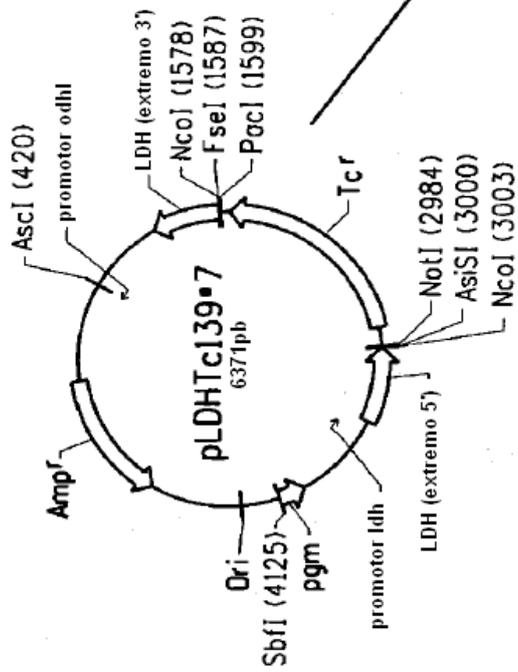


FIG. 9A

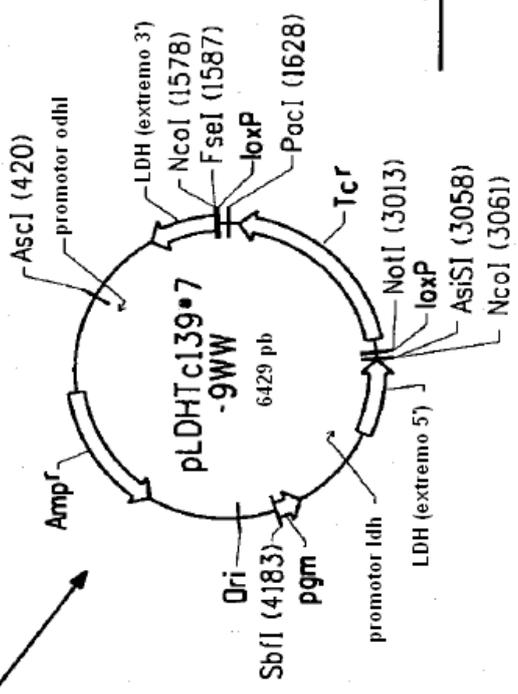


FIG. 9B

A Fig. 9C

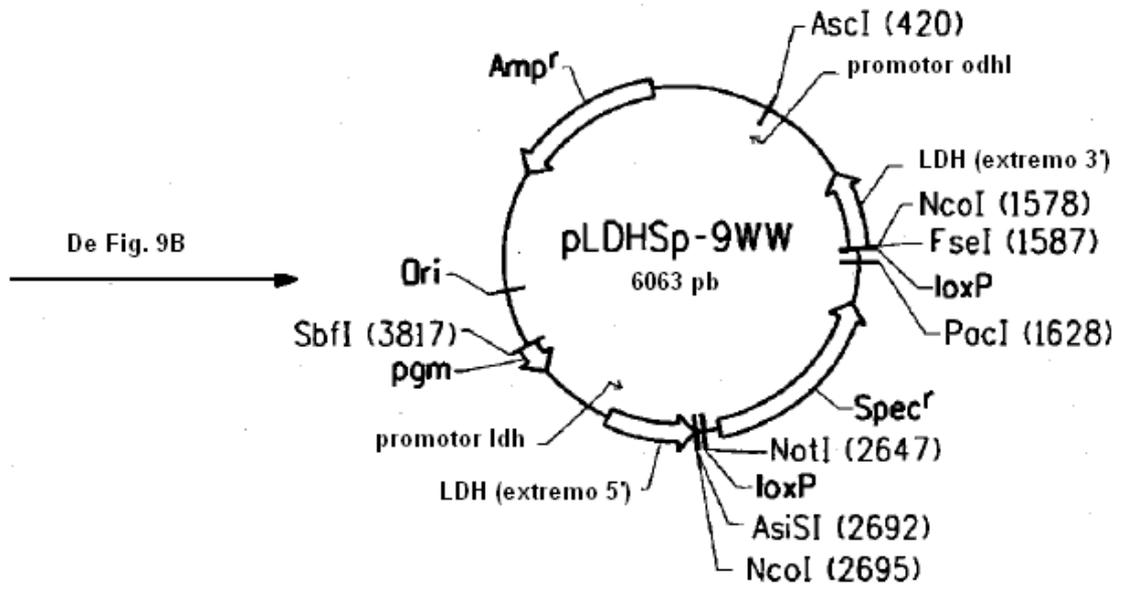


FIG. 9C

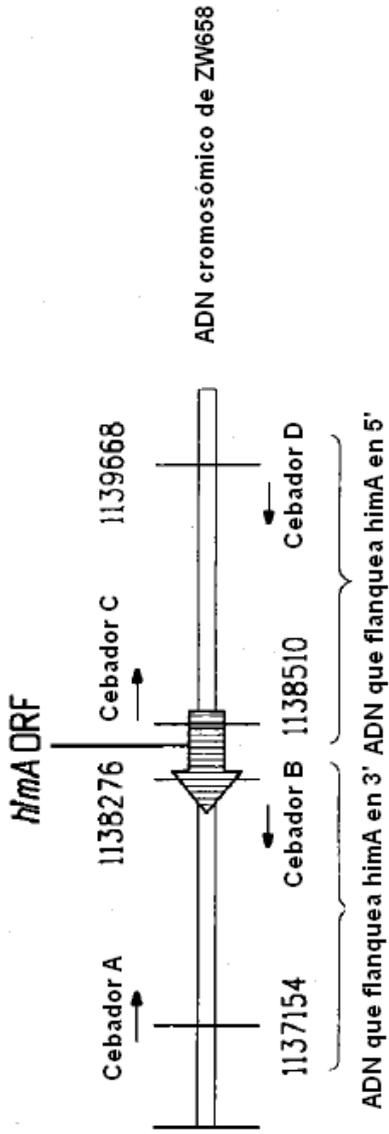


FIG. 10A

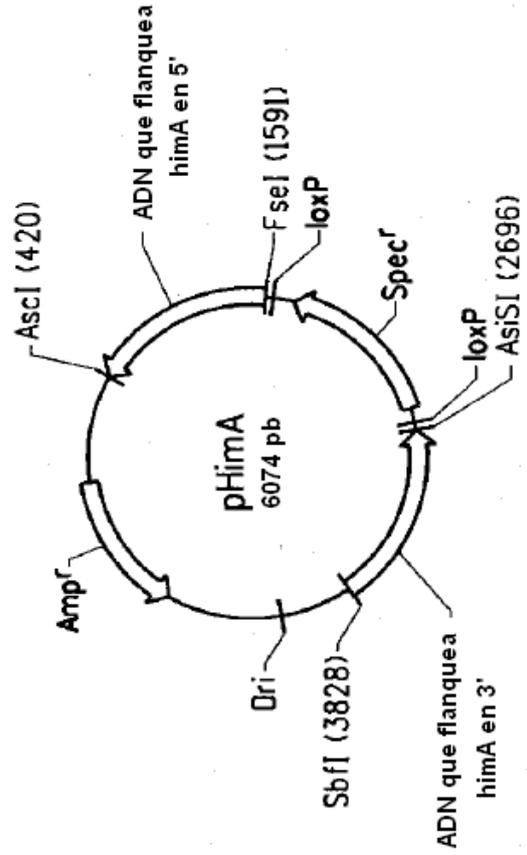


FIG. 10B

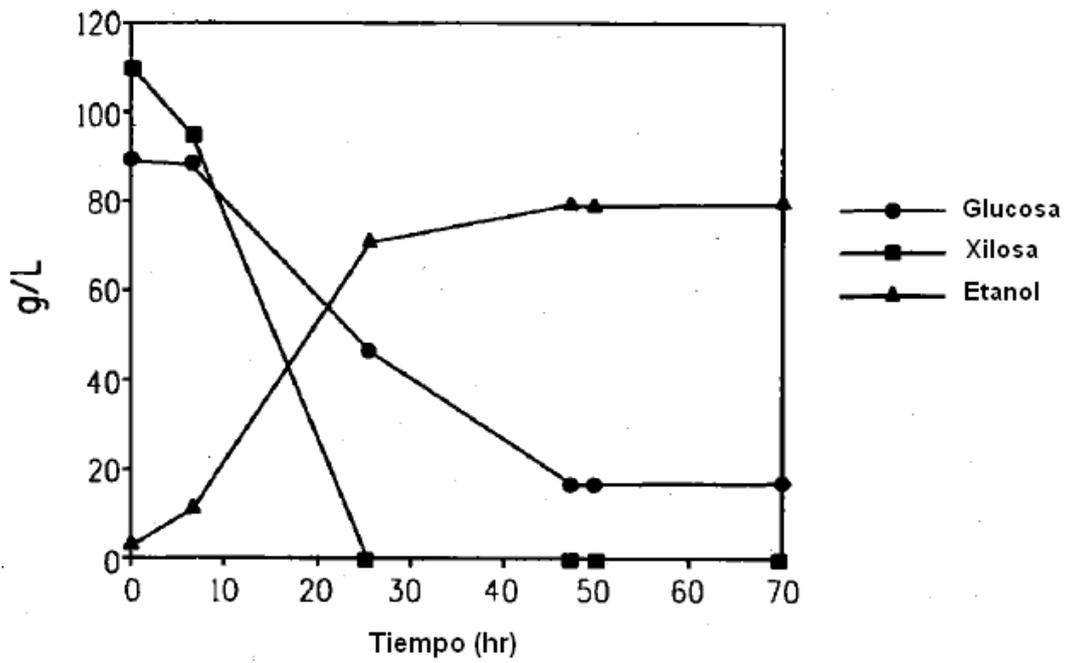


FIG. 11A

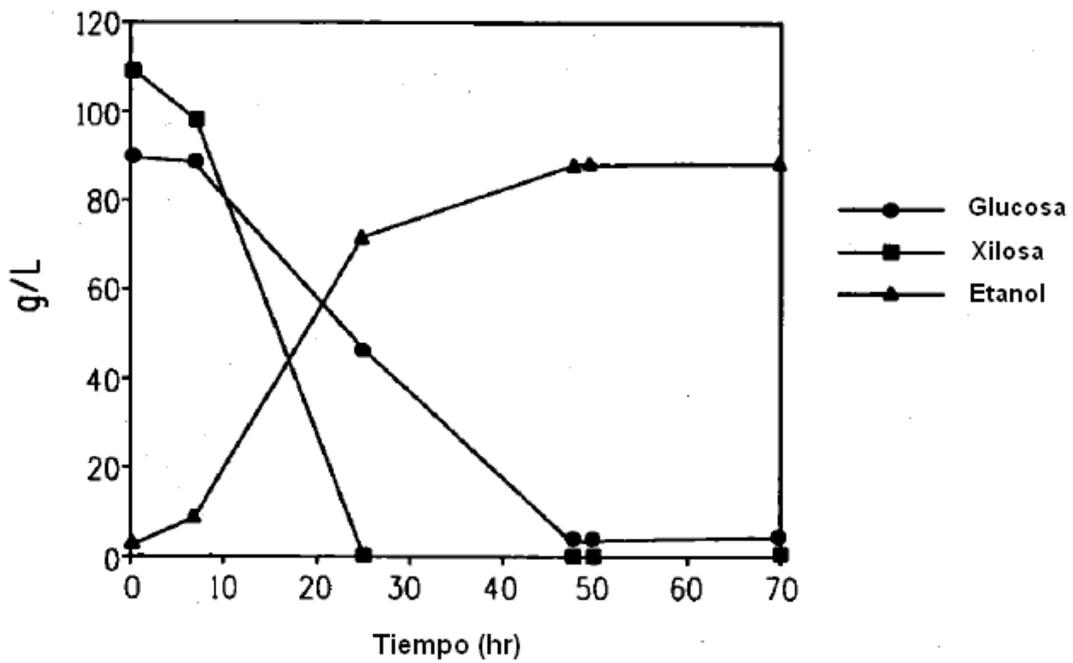


FIG. 11B

FIG. 12A

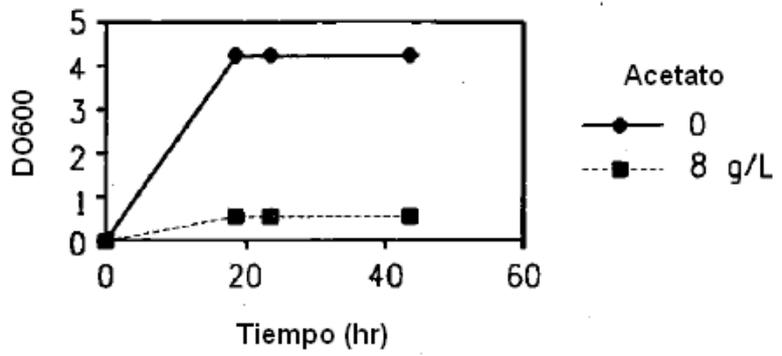


FIG. 12B

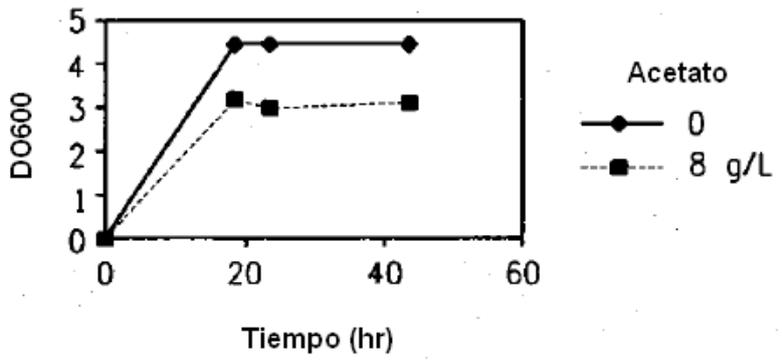


FIG. 12C

