



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 419**

51 Int. Cl.:
C12N 15/81 (2006.01)
C12P 7/08 (2006.01)
C12N 1/18 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05741945 .9**
96 Fecha de presentación : **19.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1766028**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Productividades de etanol de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentación de hidrolizados en ácidos diluidos dependientes de sus capacidades de reducción de furano.**

30 Prioridad: **19.05.2004 SE 0401303**

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:
SCANDINAVIAN TECHNOLOGY GROUP AB.
Ideon
223 70 Lund, SE

72 Inventor/es: **Nilsson, Anneli;**
Lidén, Gunnar;
Gorwa-Grauslund, Marie-Françoise;
Hahn-Hägerdal, Bärbel;
Modig, Carl Tobias y
Moreira de Almeida, João Ricardo

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 419 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

Productividades de etanol de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentación de hidrolizados en ácidos diluidos dependientes de sus capacidades de reducción de furano.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una cepa de *Saccharomices cerevisiae* que es capaz de crecer y producir etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos en presencia de compuestos y sustancias inhibidores, en particular furfural y sus derivados, mientras reduce estos compuestos y, en particular, se refiere a una cepa que es capaz de producir etanol en un sistema de producción de alimentación discontinua o continua. La invención se refiere adicionalmente al uso de cepas de *Saccharomices cerevisiae* para el crecimiento y la producción de etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos.

15 **Antecedentes de la invención**

Debido a la baja contribución neta a la producción de dióxido de carbono, el etanol producido a partir de fuentes renovables, como la lignocelulosa, es considerada una alternativa atractiva para sustituir parcialmente los combustibles fósiles (1). Muchas fuentes de materiales lignocelulósicos (por ejemplo, madera, residuos forestales y residuos agrícolas) pueden ser potencialmente usadas para la producción de etanol (2). Sin embargo, antes de la fermentación, la celulosa y la hemicelulosa en la lignocelulosa deben ser convertidas en azúcares monómeros mediante una combinación de tratamientos físicos (por ejemplo, trituración, explosión con vapor de agua), químicos (por ejemplo, ácidos diluidos) y quizás también enzimáticos. Además de los azúcares monómeros, se forman también un cierto número de otros compuestos durante estos procedimientos, varios de los cuales son potentes inhibidores. Ejemplos de estos compuestos son ácidos carboxílicos, furanos y compuestos fenólicos (3, 4, 5, 6, 7). El microorganismo usado para la fermentación de los hidrolizados consecuentemente debe exhibir tres características: a) debe tener una elevada tolerancia al etanol, b) debe ser resistente a los inhibidores que se encuentran en el hidrolizado y c) debe tener una amplia gama de utilización en sustratos, ya que el hidrolizado contiene diversos azúcares diferentes. Los azúcares cuantitativamente más importantes en el hidrolizado de abeto son glucosa, manosa y xilosa (6).

Debido a su elevado rendimiento de etanol, productividad específica elevada y elevada tolerancia al etanol, la *Saccharomices cerevisiae* es el microorganismo preferido para la conversión de hidrolizado en etanol. Se ha mostrado también que esta especie de levadura es más tolerante a inhibidores como ácido acético, furfural y 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) que otros diversos microorganismos de producción potencial (8). En particular, la tolerancia a muchos compuestos de aldehídos puede ser explicada lo más probablemente por medio de una bioconversión de estos compuestos mediante la levadura en general, en los correspondientes alcoholes menos inhibidores. Por ejemplo, es conocido que la *S. cerevisiae* convierte furfural en un alcohol furfurílico (9, 10) menos inhibidor. Con respecto a la utilización de azúcares, la *S. cerevisiae* convierte eficazmente tanto glucosa como manosa en etanol, pero es incapaz de convertir xilosa en etanol. Otras especies de levaduras, por ejemplo *Pichia stipitis* y *Candida shehatae*, son capaces de convertir xilosa en etanol. Sin embargo, estas levaduras tienen una tolerancia relativamente baja al etanol y el inhibidor y, además de ello, requieren condiciones microaeróbicas con el fin de proporcionar una productividad elevada (8, 11). Consecuentemente, se ha llevado a cabo un trabajo para tratar por ingeniería genética la *S. cerevisiae* con el fin de obtener una capacidad fermentadora de xilosa. En las levaduras que metabolizan la xilosa, la xilosa es canalizada en la trayectoria de pentosa fosfato (PPP) en un procedimiento en tres etapas. La xilosa es convertida en primer lugar en xilitol mediante una xilosa reductasa (XR). El xilitol es seguidamente oxidado en xilulosa por medio de xilitol deshidrogenasa (XHD y, finalmente, la xilulosa es fosforilada a 5-fosfato de xilulosa por medio de xilulosa quinasa (XK) (12). A las dos primeras enzimas les falta *S. cerevisiae*. Además de ello, la actividad de XK en *S. cerevisiae* se ha mostrado que es baja (3), lo que ha sugerido que limita la velocidad de consumo en cepas de *S. cerevisiae* que expresan XR y XDH (14). Sin embargo, el fondo de la cepa parece que es importante para el efecto de XK (15, 16). En el presente trabajo, se estudió una cepa genéticamente modificada que utiliza xilosa de *S. cerevisiae*: TMB3006 (17). Esta cepa expresa los genes heterólogos XYL1 y XYL2 (que codifican las enzimas XR y XDH, respectivamente) de *P. stipitis* y sobreexpresan el gen nativo XKS1 (que codifica XK).

Se ha mostrado previamente que los hidrolizados en ácidos diluidos fuertemente inhibidores, no fermentables en un procedimiento discontinuo pueden ser fermentados por medio de *S. cerevisiae* sin una destoxificación anterior en una operación de alimentación discontinua. Sin embargo, esto requiere una velocidad de alimentación cuidadosamente controlada del hidrolizado (18, 19, 20). La explicación más probable para el éxito de la operación de alimentación discontinua es que los inhibidores son mantenidos a bajos niveles debido a su conversión en compuestos menos tóxicos. En el desarrollo de una estrategia de control de bucle cerrado para la fermentación de alimentación discontinua, se usó la cepa de CBS 8066 (21) de *S. cerevisiae*. Es conocido que las diferentes cepas de *S. cerevisiae* muestran diferencias significativas en la capacidad fermentadora y la tolerancia a inhibidores en un cultivo discontinuo. En muchos trabajos de Carlos *et al.* (22) se encontraron diferencias significativas en la producción de etanol de diversas cepas en cultivos discontinuos con diferentes niveles de una combinación de inhibidores en medios sintéticos. Solamente 3 de 13 cepas ensayadas produjeron etanol en una fermentación discontinua con el nivel más elevado de la combinación de inhibidores. No solamente es importante el rendimiento en el cultivo discontinuo, sino que lo es más incluso el rendimiento en el cultivo de alimentación discontinua para la selección de una cepa adecuada. Aparte de la posibilidad de controlar el nivel de diversos inhibidores potenciales, la operación de alimentación discontinua ofrece otra ventaja en comparación con la operación discontinua, que es la posibilidad de una absorción paralela de diversos azúcares.

La razón es que la concentración de azúcares puede ser mantenida a un nivel bajo controlando la velocidad de alimentación. De esta forma, puede ser evitada la saturación de sistemas de absorción (o saturación del flujo glicolítico) haciendo posible la co-fermentación de diferentes azúcares. En la *S. cerevisiae*, la xilosa se cree que es transportada por el mismo sistema de absorción que la glucosa, sin embargo, con una afinidad mucho más baja (23). Es conocido también que una absorción concomitante de glucosa aumenta la velocidad de consumo de xilosa (24). Por lo tanto, se puede anticipar que se puede obtener una velocidad más elevada de conversión específica de xilosa en hidrolizados en cultivos de alimentación discontinua.

Larroy, C., M. R. Fernandez, G. E. X. Pares and J. A. Biosca. 2002. *Characterization of the Saccharomyces cerevisiae YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependant alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction*. Biochem J. 361:163-172 (38) han caracterizado la enzima ADHWI y ha ensayado sus características cinéticas para diversos sustratos, principalmente aldehídos alifáticos y aromáticos. En su trabajo, los autores se han concentrado principalmente en los aldehídos aromáticos (cinamaldehído y veratraldehído). Los autores sugieren que la ADHVI puede dar oportunidad a que la levadura sobreviva en entornos ligninolíticos en los que pueden estar disponibles los productos derivados de la biodegradación de la lignina. Sin embargo, no se han hecho ensayos relativos a la capacidad de la ADHVI de usar HMF como un sustrato, siendo HMF un producto derivado de hidratos de carbono. Además de ello, el documento no expone ni investiga experimentalmente la función potencial de la ADHVI en la protección o la conversión de los inhibidores que resultan de la descomposición de hidratos de carbono como celulosa y/o hemicelulosa. Larroy solamente describe la transformación de la cepa de levadura B32168 con el gen YM318C.

Dickinson, J. R., L. Eshantha, J. Salgado, and M. J. E. Hewlins. 2003. *The catabolism of amino acids to long chain complex alcohols in Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry 278:8028-8034 han estudiado la etapa final en la formación de alcoholes de cadena larga o complejos en *S. cerevisiae*. Han llegado a la conclusión de que uno cualquiera de las seis alcohol deshidrogenasas (codificadas por ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5 o SFA1) es suficiente para la fase final de formación de alcoholes de cadena larga o complejos. Se hicieron crecer cepas mutantes en aminoácidos únicos y se midió la formación de alcohol de fusel. No se hicieron mediciones de actividades enzimáticas en lisados ni ninguna medición de requisitos de co-factores. De forma importante, el gen ADH6 no fue estudiado en absoluto, ya que se consideró improbable por los autores que una enzima dependiente de NADPH estuviera involucrada en la formación de alcohol de fusel. El documento de Dickinson *et al.*, por lo tanto, está completamente desligado de la conversión de HMF y furfural y está completamente desligado de cualquier conversión catalizada por el producto génico de ADH6.

Martín, C. and L. J. Jönsson. 2003. *Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of Saccharomyces and Zygosaccharomyces to lignocellulose-derived fermentation inhibitors*. Enzyme and Microbial Technology 32:386-395, (3) han realizado una comparación entre 13 cepas de levaduras diferentes con respecto a su resistencia a inhibidores de fermentación de derivados de lignocelulosa. Las cepas son expuestas a los siguientes inhibidores: ácido fórmico, ácido acético, furfural, HMF, ácido cinámico y coniferil-aldehído. Se llegó a la conclusión de que hay una gran diferencia entre la capacidad de las cepas para tolerar y convertir los inhibidores. Sin embargo, no se presentan investigaciones mecanísticas sobre las enzimas responsables de la conversión en el documento. Específicamente, no hay ninguna referencia respecto al producto génico de ADH6 ni a la dependencia de co-factores en la reducción en el documento.

Larsson, Simona *et al* 1971. *Ethanol from Lignocellulose - Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of Saccharomyces Cerivisiae for increased resistance*, Applied Microbiology. Larsson *et al.* han estudiado diferentes métodos de destoxificación, de los que el método más eficaz fue la cromatografía de intercambio aniónico.

Horváth, Ilona Sárvári *et al.* 2003. *Effects of furfural on the respiratory metabolism of Saccharomyces cerivisiae in Glucose-Mimited Chemostats*. Microbiología aplicada y medioambiental, Vol. 69, pág. 4076-4086. Horváth *et al* han estudiado los efectos fisiológicos del furfural sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante el crecimiento respiratorio sobre glucosa.

Wahlbom, C. Fredrik *et al.* *Furfural, 5-hidroxymethyl furfural and acetoin act as an extrem electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant Saccharomyces cerivisiae*, Biotechnology and Bioengineering, Apr 2002, Vol. 78, No. 2, p. 172-778. Wahlbom *et al.* han estudiado la influencia de aceptores de electrones externos (acetoína, acetaldehído, furfural y HMF) sobre la fermentación de xilosa en un medio de laboratorio usando *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, que alberga genes para xilosa reductasa, xilitol deshidrogenasa y xiluloquinasa. Se muestra que el furfural (pero no el HMF) como aceptor de electrones externos está conduciendo a la fermentación de xilitol reducido. Los experimentos no han sido realizados en un hidrolizado lignocelulósico.

Taherzadeh, M.J. *et al.* *Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Technol, 2000, vol. 53, pg. 701-078. Taherzadeh *et al* han estudiado los efectos fisiológicos de 5-hidroximetilfurfural (HMF) sobre la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 806 en presencia y ausencia de furfural. Taherzadeh *et al.* plantearon una hipótesis de que las alcohol deshidrogenasas convierten HMS y furfural en sus correspondientes alcoholes.

Wahlborn, C. Fredrik *et al.* *Generation of the improved recombinante xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with pichia stipitis CBS 6054*, FEMBS Yeast

Research, 2003, Vol. 3, pg. 319-326. Wahlbom *et al.* describen una nueva *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 que utiliza xilosa recombinante mejorada. Este dato de la técnica anterior no expone la influencia que los HMF inhibidores y el furfural puedan tener sobre la fermentación de cepas de levaduras.

5 Kuyper, M. *et al.* *Minimal metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle*. MEBS Yeast Research, 2004, Vol 4, No. 6, pg 655-664. Kuyper *et al.* describen que el tratamiento de ingeniería genética mínimo en la forma de la incorporación del gen XylA en *Saccharomyces cerevisiae* es necesaria para obtener una trayectoria metabólica de xilosa funcional. Este dato de la técnica anterior no expone la influencia que los HMF inhibidores y el furfural puedan tener sobre la fermentación de las cepas de levaduras.
10

Sumario de la presente invención

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-5D productora de etanol, que es capaz de crecer y producir etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos que comprenden compuestos inhibidores del crecimiento del grupo furfural y 5-hidroxi-metil-furfural, en una fermentación discontinua, de alimentación discontinua o continua, cepa que está sin regular y/o sobreexpresada con respecto al gen ADH6, en que la alcohol deshidrogenasa es dependiente de NADPH.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* productora de etanol para hacer crecer y producir etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos que comprenden compuestos inhibidores del crecimiento del grupo furfural y 5-hidroxi-metil-furfural, en una fermentación discontinua, de alimentación discontinua o continua, cepa que está sin regular y/o sobreexpresada con respecto al gen ADH6, en que la alcohol deshidrogenasa es dependiente de NADPH.

25 En una realización de la invención, dicha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es la *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-5D. En otra realización, dicho uso de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es para la reducción de furfural.

30 En el presente trabajo, fueron caracterizadas diferentes cepas de *S. cerevisiae* en fermentaciones tanto discontinuas como de alimentación discontinua de hidrolizados en ácidos diluidos. Se estudió un total de cuatro cepas diferentes: CBS8066, levadura de panadería comercial, TMB3000 y TMB3006. Se determinaron la productividad de etanol específica, velocidad de crecimiento específica, velocidades de consumo de monosacáridos, viabilidad celular y actividades de reducción de furano. Los resultados sugieren que la capacidad reductora de furano es un factor clave en relación con la tolerancia a hidrolizados lignocelulósicos.
35

Materiales y Métodos

Cepas y medio usado

40 Las cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas se proporcionan en la Tabla 1. Las cepas se mantuvieron sobre placas de agar con la siguiente composición: 10/g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona de soja, 20 g/l de Agar y 20 g/l de glucosa. Los cultivos de inóculos se hicieron crecer en matraces E con tapones de algodón de 300 ml con 100 ml de medios sintéticos según Taherzadeh *et. al.* (25) con 15 g/l de glucosa como fuente de carbono y energía.
45 Los cultivos de inóculos se hicieron crecer durante 24 h a 30°C y con una velocidad del agitador de 150 rpm antes de que se añadieran 20 ml al fermentador para comenzar el cultivo.

Condiciones de fermentación

50 *Medio de hidrolizado*

55 El hidrolizado usado se produjo a partir de residuo forestal, procedente principalmente de abeto, en un procedimiento de hidrólisis en ácidos diluidos de dos fases usando ácido sulfúrico como catalizador (19). Los hidrolizados obtenidos de las dos fases se mezclaron y se almacenaron a 8°C hasta que se usaron. La composición del hidrolizado se proporciona en la Tabla 2.

Cultivo discontinuo inicial

60 Se realizaron experimentos de fermentación en bio-reactor BioFlo III de 3,3 l (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). La velocidad de agitación fue de 400 rpm y el fermentador fue continuamente rociado con 600 o 1.000 ml/minuto de gas nitrógeno (el contenido de oxígeno se garantizó que era de menos de 5 ppm, ADR clase 2, 1(a), AGA, Suecia). El pH se mantuvo a 5,0 con NaOH 2,0 M. Todos los experimentos comenzaron con una fase discontinua inicial en 1 l de medios sintéticos según Taherzadeh *et. al.* (25) con 50 g de glucosa como fuente de carbono y energía. Sin embargo, las concentraciones de componentes de los medios distintos de glucosa fueron triplicadas para compensar la dilución durante la operación de alimentación discontinua. La alimentación de hidrolizado se comenzó al agotamiento de la glucosa cuando la velocidad de desprendimiento de carbono había disminuido hasta menos de 1 mmol/h.
65

ES 2 361 419 T3

Fermentación discontinua y de alimentación discontinua

Se hicieron dos tipos de experimento de fermentación para cada cepa. En el primer tipo de experimento, se añadieron 1,5 litros de hidrolizado al reactor usando la velocidad de alimentación máxima de la bomba del medio (aproximadamente 2 litros/h) después del cultivo de la tanda inicial. Esto se denomina fermentación “discontinua” el segundo tipo de experimento fue un experimento de alimentación discontinua, en el que la velocidad de alimentación del hidrolizado fue controlada usando un método de respuesta por etapas desarrollado por Nilsson *et al.* (19). Brevemente, la velocidad de alimentación se alteró de una manera por etapas en la que el aumento por etapas fue proporcional a la derivada del desprendimiento de dióxido de carbono medido a partir de la etapa previa. El control de la velocidad de alimentación se obtuvo controlando la frecuencia de una bomba peristáltica (Watson-Marlow Alitea AB, Suecia). También en estos experimentos, se añadió un total de 1,5 l de hidrolizado.

Fermentación de xilosa

Se hicieron experimentos adicionales de alimentación discontinua con la levadura fermentadora de xilosa (TMB3006) usando velocidades de alimentación bajas (12,5 y 25 ml/h). La finalidad de estos experimentos fue obtener concentraciones de medio bajas de glucosa y manosa, que se espera que proporcionen una velocidad de absorción aumentada de xilosa.

Análisis

Análisis de gases desprendidos

Se usó un verificador de gases (modelo 1311, Brüel and Kjaer, Dinamarca) (descrito por Christensen *et al.*) para medir la velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono (CER). El analizador de gases tenía tres canales para la medición de dióxido de carbono, oxígeno y etanol en el gas desprendido del reactor. La señal del etanol fue calibrada frente a las concentraciones de etanol medidas en el caldo de cultivo mediante HPLC, ya que se supuso que el etanol en la fase gaseosa estaba en equilibrio con el etanol en el caldo de cultivo. La calibración para el oxígeno y el dióxido de carbono se hizo usando un gas que contenía 20,0% de oxígeno y 5,0% de dióxido de carbono.

Biomasa

Se usó un sistema de análisis de inyección de flujo (FIA) (26) para medir la concentración de biomasa en el reactor. Esto se hizo midiendo la densidad óptica a 610 nm, a una frecuencia de 1 h^{-1} . Después de cada fermentación, la señal de FIA fue calibrada frente al peso en seco medido. Las muestras de 10 ml por duplicado del caldo de cultivo de la fermentación se centrifugaron a 3.000 rpm durante 3 minutos en tubos previamente pesados. Las células se lavaron con agua destilada, se centrifugaron nuevamente y se secaron durante una noche a 105°C antes de ser nuevamente pesadas. El peso en seco se midió tres veces durante cada fermentación.

Viabilidad

La viabilidad celular se midió como la relación entre unidades formadoras de colonias (CFU) y números de células contadas tres veces durante cada fermentación. Se retiraron muestras del caldo de cultivo de fermentación y se diluyeron para proporcionar una concentración de aproximadamente 1.000 células/ml y los valores de CCU se determinaron a partir de placas de Agar por triplicado en las que se extendieron muestras de 0,1 ml de caldo de cultivo diluido. Los números de células se calcularon bajo microscopio usando una cámara de Bürker. Antes del cálculo, las muestras se diluyeron 100 veces.

Concentraciones de metabolitos

Las muestras para el análisis de las concentraciones de metabolitos se tomaron regularmente del reactor. Las muestras se centrifugaron y se filtraron a través de filtros de $0,2 \mu\text{m}$. Se midieron las concentraciones de glucosa, manosa, xilosa, galactosa y arabinosa en una columna Aminex HPX-87P (Bio-Rad, USA) a 80°C . Se midieron las concentraciones de etanol, HMF, furfural, glicerol y ácido acético en una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA) a 65°C . Todos los compuestos fueron detectados con un detector del índice de refracción, excepto el HMF y el furfural, que se detectaron con un detector UV (210 nm).

Para compensar el etanol evaporado durante las fermentaciones, la fracción en moles de etanol en la fase gaseosa se supuso que era proporcional a la fracción en moles de etanol en la fase líquida. Se puede estimar así la cantidad de etanol evaporado mediante la integración del flujo de gas que salía de la reacción multiplicado por la fracción en moles de etanol en el gas, como se describe por Nilson *et al.* (18).

Actividades enzimáticas

Preparación de extractos celulares

Se prepararon extractos celulares para las mediciones de las actividades enzimáticas en las cepas TMB3000 y CBS 8066. Los extractos en bruto se prepararon usando reactivo Y-PER (Pierce, Rockford, IL, USA). Los extractos celu-

ES 2 361 419 T3

lares se mantuvieron en un ultra-congelador (-80°C) hasta que se usaron. El contenido de proteínas en la preparación exenta de células se determinó por medio de un reactivo de ensayo de proteínas Coomassie usando albumina de suero bovino como patrón (Pierce, Rockford, IL, USA).

5 *Medición de la actividad reductora de furfural y HMF*

La actividad reductora del furfural y HMF se midió según Wahlbom *et. al.* (27). Se diluyeron 20 μ l del extracto exento de células (diluido diez veces en tampón de fosfato 100 mM) en 2,0 ml de tampón de fosfato 100 mM (KH_2PO_4 50 mM y K_2HPO_4 50 mM) y se añadió furfural a una concentración de 10 mM. Las muestras se calentaron a 30°C y posteriormente se comenzó la reacción mediante la adición de NADH a una concentración de 100 μ M. La oxidación de NADH fue seguida como el cambio de absorbancia a 340 nm. Se repitió el mismo procedimiento con NADPH como co-factor, pero la cantidad de muestra se aumentó hasta 200 μ l debido a la inferior actividad. El volumen total era todavía de 2,0 ml y las concentraciones de furfural y NADH fueron de 10 mM y 100 μ M respectivamente.

15 Se repitió el mismo procedimiento para la medición de la capacidad reductora de HMF. Se usaron 200 μ l de extracto celular diluido excepto para la medición de la cepa TMB3000 con NADH como co-factor, en la que se usó una muestra de 20 μ l debido a la superior actividad. La concentración de HMF fue de 100 mM. Las actividades se midieron tanto con NADH como con NADPH.

20 *Medición de la actividad de ADH*

La actividad de ADH se midió según Bruinenberg *et. al.* (28). El extracto exento de células se diluyó 10 veces y se añadieron 20 μ l de esta dilución a 2,0 ml de tampón de fosfato 100 mM. Se añadió etanol para proporcionar una concentración de 100 mM. Después de calentar a 30°C, se comenzó la reacción mediante la adición de NAD^+ a una concentración de 100 μ M. La reducción de NAD^+ se siguió como el cambio de absorbancia a 340 nm.

Cultivos continuos

Para analizar el contenido de mRNA en la cepa CBS 8066 y TMB3000 se realizaron cultivos continuos. Los medios sintéticos fueron según (25), pero un 33% más concentrados y la concentración de glucosa era de 20 g/l. El volumen de líquido en el reactor (reactor Belach BR 0.5, Belach Bioteknik AB, Solna, Suecia) era de 500 ml y después de que se consumió la glucosa en la tanda, la alimentación se comenzó a una velocidad de dilución de 0,1 h^{-1} . El reactor fue rociado con 300 ml de nitrógeno/minuto. El pH se mantuvo a 5,0 con NaOH 0,75 M y la temperatura a 30°C. La velocidad del agitador se ajustó a 500 rpm. Para investigar los genes que fueron inducidos mediante HMF, se tomaron muestras de células para un análisis de mRNA tanto antes de la alimentación al reactor con medios sin HMF como con medios que incluían 0,5 g de HMF l-1. Para conseguir un estado estacionario en el reactor, se tomaron las muestras en 5 tiempos de residencias después del comienzo de la alimentación o del cambio en los medios de alimentación.

40 *Preparación de mRNA*

Las muestras del reactor se centrifugaron en hielo a 3.000 rpm durante 1 minuto y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta que se aisló el mRNA de las muestras. El mRNA se aisló usando un estuche de ensayo rápido de RNA (Q-biogene, USA). El mRNA seguidamente se purificó, se sintetizó cDNA, se transcribió *in vitro* y se fragmentó como se describe por Affymetrix. La hibridación, lavado, tinte y exploración de biochips (Yeast Genome S98 Arrays) se hicieron con una estufa Affymetrix Gene Chip Oven 640, un dispositivo Fluidics Station 400 y un explorador Gene Array Scanner(Affymetrix).

ExClone

50 Se hicieron crecer cepas seleccionadas (sobrexpresando *LAT1*, *ALD6*, *ADH5*, *ADH6*, *GDH3*, *OYE3*, *IDP3*, *ADH7*, *AAD15*, *ERG27*, *HMG1*, *LYS5*, *SPS19*, *SGE1*) de la colección ExClone (Resgen, Invitrogen Corporation (Reino Unido)) en matraces agitados de 300 ml (con capturas de dióxido de carbono) que contenían 100 ml de medios de omisión 5D-Ura y 40 g/l de glucosa, como se describe por el proveedor. Sin embargo, se añadió Cu^{2+} 80 μ M cuando los matraces agitados fueron inoculados y se usó tampón de fosfato 100 mM. Se tomaron muestras para mediciones de la actividad enzimática después de 16 horas de crecimiento a 30°C y 150 rpm.

Resultados

60 Se realizaron fermentaciones discontinuas y de alimentación discontinua con cuatro cepas de levaduras. Después de una fase de crecimiento discontinuo inicial en medios sintéticos, se añadieron 1,5 litros de hidrolizado al reactor. En las fermentaciones discontinuas se añadió hidrolizado a la velocidad máxima (aproximadamente 2.000 ml/h), mientras que en los experimentos de alimentación discontinua la velocidad de alimentación fue controlada usando un algoritmo de control de bucle cerrado. Brevemente, la velocidad de alimentación se alteró de una manera por etapas, en la que el aumento de etapas era proporcional a la derivada de la velocidad medida de desprendimiento de dióxido de carbono a partir de la etapa previa. El control de la velocidad de alimentación se obtuvo controlando la frecuencia de una bomba peristáltica (Watson-Marlow Alitea AB, Suecia). (Véase la sección de Materiales y Métodos).

Fermentación discontinua

Había diferencias significativas entre las cepas, en particular con respecto a las velocidades de fermentación, como se refleja por medio de la velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono (Fig. 1). También la velocidad de crecimiento específico, viabilidad y conversión de los inhibidores HMF y furfural variaba entre las cepas (Fig. 2). La productividad específica de etanol obtenida con la cepa CBS 8066 era claramente inferior a la de las otras cepas y disminuyó gradualmente durante toda la fermentación para esta cepa, aunque los azúcares de hexosa, glucosa y manosa finalmente se consumieron por completo por todas las cepas. Ninguna de las cepas fue capaz de crecer en un cultivo discontinuo sobre hidrolizado, pero hubo grandes diferencias con respecto al mantenimiento de la viabilidad. La viabilidad de la cepa CBS 8066 disminuyó hasta 16% en unas pocas horas después del comienzo de la fermentación del hidrolizado (tabla 2). Por el contrario, las cepas con las productividades medias más elevadas de etanol, TMB3000 y TMB3006, tenían una viabilidad de 77 y 100%, respectivamente. Estas cepas tenían también una CER más constante durante el transcurso de la fermentación, sin la disminución observada para las demás cepas (Fig. 1) y fueron capaces de disminuir las concentraciones de HMF hasta un alcance mayor que las otras cepas (Fig. 2). La productividad, viabilidad y conversión de HMF de la levadura de panadería comercial estuvo aproximadamente entre las de CBS 8066 y TMB3000.

Fermentación de alimentación discontinua

La productividad de etanol fue mayor en la alimentación discontinua en comparación con la fermentación discontinua para todas las cepas ensayadas (Tabla 6). Para CBS 8066, la productividad media de etanol aumentó en un 131%. Sin embargo, no se pudo evitar una disminución gradual de la CER y no hubo ningún crecimiento celular, aunque se mantuvo una viabilidad elevada. De hecho, la viabilidad se mantuvo bien para todas las cepas durante el funcionamiento en alimentación discontinua.

Aparte de la CBS 8066, las demás cepas crecieron en la fermentación de alimentación discontinua (Fig. 2). La cepa de levadura de panadería comercial tuvo una productividad media de etanol tan elevada como la CBS 8066, y para esta cepa la CER aumentó también durante toda la fase de alimentación discontinua. La productividad media de etanol fue un 100% mayor para la mayoría de las cepas eficazmente fermentadoras TMB3000 y TMB3006 que para la CBS 8066. De forma importante, estas dos cepas fueron capaces también de crecer en un hidrolizado con una velocidad de crecimiento específica "media" de aproximadamente $0,12 \text{ h}^{-1}$. Las concentraciones de inhibidores de furano se mantuvieron a niveles muy bajos (Fig. 2). La incorporación de los genes heterólogos en TMB3006 aparentemente no afectó a la resistencia inhibitoria o a la velocidad de flujo de azúcares, ya que la TMB3006 se comportó de forma similar a la TMB3000, en una fermentación tanto discontinua como de alimentación discontinua.

La cepa que porta genes que codifica XR, XDH y XK cromosomalmente integrados, TMB3006, consumía un 6% de la xilosa en el hidrolizado. La xilosa se supuso que se convertía en etanol, ya que no se detectó xilitol (Fig. 3). Para mejorar la absorción de xilosa en el fermentador, la concentración de glucosa y manosa se disminuyó usando fermentaciones de alimentación discontinua con una baja velocidad de alimentación constante. La velocidad de alimentación se ajustó a 25 ml/h 17 horas después del comienzo del experimento y después de 31 horas la velocidad de alimentación se disminuyó hasta 12,5 ml/h (Fig. 3). El consumo de xilosa para TMB3006 aumentó hasta 62%. Sin embargo, un 55% de la xilosa consumida por TMB3006 se convirtió en xilitol.

Actividad enzimática

Se midió la capacidad de reducción de furfural y HMF sobre una muestra de extracto celular tomada durante los experimentos de alimentación discontinua. Las actividades enzimáticas se midieron con NADH y NADPH como co-factores (Fig. 4). Las actividades fueron superiores para TMB3000 que para CBS 8066 en todos los casos. Para la reducción de furfural con NADH como co-factor, la actividad de TMB3000 fue dos veces más elevada que la de CBS 8066 y con NADPH como co-factor fue 4 veces mayor. La mayor diferencia se observó para la actividad de reducción de HMF usando NADH como co-factor. Esta actividad fue muy baja en CBS8066, pero varios centenares de veces mayor en TMB3000. También con NADPH como co-factor fue mayor pero solo aproximadamente 4 veces mayor.

Ya antes de la adición de cualquier hidrolizado, había una diferencia clara entre las actividades de las dos cepas (Fig. 4). La actividad dependiente de NADH fue casi constante durante la alimentación discontinua, indicando que la(s) enzima(s) responsable(s) probablemente ya no estaba(n) inducida(s) por el hidrolizado en cualquiera de las cepas. Con respecto a la conversión dependiente de NADPH, las cepas se comportaron de forma diferente. La actividad aumentó con el tiempo para TMB3000 pero fue casi constante para CBS 8066.

Para TMB3000 la actividad de ADH fue como media un 40% mayor que para CBS 8066 (Fig. 6). La diferencia en la conversión de furfural por tanto no pudo ser explicada mediante la mera diferencia en la actividad de ADH total, sino que puede ser relacionada con las diferencias en la actividad relativa de las diferentes formas de ADH o con cambios específicos de cepas en la proteína ADH.

Análisis de expresión

Para investigar la(s) enzima(s) que era(n) responsable(s) de las elevadas velocidades de conversión en HMF y, en particular, con NADH como co-factor, se realizaron cultivos continuos con TMB3000 y CBS 8066 con y sin

HMF presente en los medios sintéticos. Se investigaron genes conocidos de reductasa e hidrogenasa que fueron sobre-regulados al menos dos veces en TMB3000 en comparación con la cepa CBS 8066, con y sin presencia de HMF. Como se puede observar en la Fig. 6, especialmente CPS19 y ADH2 resultaron ser candidatos alentadoramente buenos, ya que se sobreexpresaron elevadamente en TMB3000 y adicionalmente fueron inducidos también por HMF.

Ensayo de mutantes que sobreexpresan genes dianas seleccionados

Las cepas de la colección ExClone en las que los genes identificados a partir del análisis de nRNA anteriormente descrito fueron sobre-regulados, se hicieron crecer en cultivos de matraces agitados y se midieron las actividades obtenidas para la reducción de furanos (Fig. 7). Ninguna cepa que sobreexpresaba CPS19 y ADH2 mostró una capacidad aumentada para reducir HMF o furfural. Sin embargo, las cepas que sobreexpresaban CFA1, ADH6 y ADH7 sí que tuvieron una capacidad de conversión aumentada. La actividad encontrada en la cepa con ADH6 sobre-regulada fue particularmente pronunciada. Sin embargo, la preferencia de co-factor fue NADPH para la conversión de furfural y de HMF. Una cepa, la cepa que sobreexpresa SFA1, mostró una capacidad de conversión aumentada de HMF con NADH como co-factor (como se puede observar para TMB3000 en comparación con CBS 8066).

Los presentes experimentos demuestran claramente que la capacidad de *S. cerevisiae* para fermentar hidrolizados en ácidos diluidos de material celulósico es altamente específica para las cepas. De forma importante y de acuerdo con trabajos previos sobre la cepa CBS 8066 (29, 20, 19, 18), se obtuvieron productividades más elevadas en un funcionamiento de alimentación discontinua para todas las cepas ensayadas. Las productividades específicas de etanol para las cepas más tolerantes a inhibidores (TMB3000 y TMB3006) aumentaron en un 69% en comparación con un funcionamiento discontinuo. El crecimiento en el cultivo discontinuo fue despreciable para todas las cepas, pero la productividad específica de etanol varió significativamente entre las cepas y también en la fermentación discontinua. Por el contrario, todas las cepas, con la excepción de la cepa CBS 8066, en alguna medida crecieron en cultivos de alimentación discontinua anaeróbicos. El menor grado de inhibición en el cultivo de alimentación discontinua fue atribuido lo más probablemente a la conversión *in situ* de uno o más inhibidores que incluyen compuestos de furano y otros aldehídos (30, 31, 22).

Los efectos fisiológicos del furfural sobre *S. cerevisiae* han sido previamente estudiados en forma intensiva en medios de modelos sintéticos. Se ha mostrado en un cultivo de quimioestado que contiene furfural (tanto anaeróbico como aeróbico) que el crecimiento es inhibido si la velocidad de conversión específica de furfural sobrepasa una velocidad de conversión crítica máxima. Durante las condiciones anaeróbicas, la velocidad determinante es la velocidad de reducción a alcohol furfúrico, mientras que para las condiciones aeróbicas la velocidad crítica en lugar de ello es la velocidad de oxidación para formar ácido furoico. A una carga de alimentación de furfural demasiado elevada, la concentración de furfural aumenta en el medio, lo que conduce supuestamente a la inhibición de un cierto número de enzimas claves que incluyen PDH y AIDH y se produce una supresión por lavado. Para la cepa CBS 8066, la velocidad de conversión específica crítica de furfural se encontró que estaba entre 0,10 y 0,15 g/g h durante las condiciones anaeróbicas. En el presente trabajo, la concentración de furfural era muy baja (<0,04 g/l) en todos los cultivos de alimentación discontinua y parece que la velocidad de conversión crítica de furfural no se sobrepasó. Sin embargo, hubo diferencias mayores con respecto a las concentraciones de HMF. En los cultivos con las cepas de mejores crecimientos TMB3000 y TMB3006, la concentración de HMF se mantuvo a un nivel relativamente bajo (<0,23 g/l) mientras que en la fermentación de alimentación discontinua con CBS 8066 solo tuvo lugar una conversión pequeña de HMF. Para las dos cepas CBS 8066 y TMB3000, se repitieron las fermentaciones de alimentación discontinua y se midieron las actividades de reducción de furfural y HMF (Fig. 4). En un medio industrial, la concentración de furfural puede ser de 1 g/l a 3 g/l, dependiendo de su origen.

Normalmente, el alcohol furfúrico será medido cuando la fermentación es anaeróbica y el producto seguidamente es casi exclusivamente alcohol furfúrico.

La capacidad de transformación, velocidad de conversión (determinada mediante la actividad enzimática) determina lo rápido que es posible añadir los furanos. Si deben ser añadidos demasiado rápido, los furanos se acumularán en el medio, lo que conducirá a una inhibición de las funciones centrales por medio de interacciones entre los furanos y un cierto número de enzimas como PDH, PDC y otras. Esto conduce a su vez a un crecimiento del inhibidor y a una infra-regulación de la velocidad de fermentación.

Las actividades enzimáticas medias para la conversión de furfural y HMF en CBS 8066 fue similar a las encontradas para la cepa TMB3001, una cepa derivada de CEN.PK 113-7A. Las actividades medias para la conversión de furfural en CBS 8066 fueron de 353 mU/mg de proteína con NADH como co-factor y de 22,8 mU/mg de proteína con NADPH como co-factor, en comparación con 490 y 22 mU/mg de proteína, respectivamente, encontradas para TMB3001. Para la conversión de HMF, las actividades medias para CBS 8066 fueron de 1,8 mU/mg de proteína (NADH) y 12,4 mU/mg de proteína (NADPH), en comparación con 2,2 y 22 mU/mg de proteína, respectivamente, para TMB3001. Las actividades enzimáticas obtenidas para la cepa TMB3000 fueron muy diferentes. La actividad de reducción media de furfural fue varias veces mayor que para CBS 8066 y TMB3001, aunque la presencia de co-factor fue similar. Sin embargo, la diferencia más llamativa fue la elevada actividad para la reducción de HMF con NADH como co-factor (Fig. 4). Esta actividad fue de hecho más de 150 veces mayor para TMB3000 que para las otras dos cepas. También, la velocidad de reducción acoplada a NADPH fue varias veces mayor para TMB3000 que para CBS 8066.

ES 2 361 419 T3

Las actividades de conversión de furfural y HMF proporcionan una explicación de la ventaja de TMB3000 sobre CBS 8066 en la fermentación de lignocelulosa. Las actividades elevadas aseguran unas elevadas velocidades de conversión de furfural a HMF y, posiblemente, otros aldehídos inhibidores (32) de forma que la concentración de estos inhibidores es mantenida a valores bajos durante la fermentación. Para la cepa CBS 8066 la actividad *in vitro* medida para la reducción de furfural se correspondería con una velocidad de reducción *in vivo* de 0,69 g/g h. Esto concuerda de hecho con la velocidad de conversión máxima descrita en medios sintéticos para la misma cepa (0,6 g/g h). La velocidad de conversión específica prevista correspondiente de HMF sería de 0,03 g/g h, que es algo inferior al valor descrito en medios sintéticos de 0,14 g/g h. Para la cepa TMB3000, las actividades de reducción *in vitro* medidas para furfural y HMF fueron de 2,26 g/g h y 0,98 g/g h, respectivamente, y esto correspondería con velocidades de alimentación de aproximadamente 3 l/h, a la densidad y volúmenes celulares usados que son mucho mayores que los aplicados en el presente trabajo (véase la Fig. 2). Sin embargo, para CBS 8066, las actividades para la conversión de HMF se corresponden a una velocidad de alimentación de solamente 100 ml/h. Otro factor que se debe considerar es la diferencia en la preferencia de co-factores para la conversión de HMF. Como la NADH es el co-factor preferido en la conversión de HMF, no habrá pérdidas de NADPH que compitan con reacciones anabólicas en la cepa TMB3000.

Hubo una considerable actividad de reducción de furano en el extracto celular ya antes de que las células hubieran sido expuestas a los inhibidores del hidrolizado y, además de ello, las mediciones de actividad mostraron que la actividad de reducción de furano no aumenta significativamente con el tiempo durante la exposición al hidrolizado, indicando que no fueron inducida(s) la(s) enzima(s) responsable(s). La capacidad para reducir furfural ha sido previamente atribuida a la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (32, 33), aunque esto ha sido puesto en duda (35). La relación entre las actividades de ADH medidas para CBS 8066 y TMB3000 (Fig. 5) fue mucho más cercana a uno que la relación entre las correspondientes actividades de reducción de furfural. Este descubrimiento sugiere que pueden ser importantes también otras enzimas en la conversión de furfural o que las ADH en las diferentes cepas pueden tener afinidades diferentes para el furfural debido, por ejemplo a mutaciones puntuales.

Se muestra adicionalmente a continuación que la enzima codificada por el gen ADH6 en *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de convertir HMF usando el co-factor NADPH. Las cepas de levaduras que sobreexpresan este gen tienen una velocidad de conversión sustancialmente superior de HMF en cultivos tanto aeróbicos como anaeróbicos. De forma importante, se ha mostrado además que las cepas que sobreexpresan ADH6 tienen una productividad de etanol sustancialmente superior y se ven menos afectadas por una inhibición durante la fermentación de hidrolizado de lignocelulosa en ácido diluido. Las cepas genéticamente modificadas para proporcionar una expresión elevada de ADH6, por lo tanto, serán ventajosas para la conversión de hidrolizados lignocelulósicos.

35 *Materiales y métodos*

Cepas y constructos genéticos

El gen alcohol deshidrogenasa VI (ADH6) de *Saccharomyces cerevisiae* TMB3000 y CEN.PK 113-5D fueron amplificados usando los cebadores ADH6-FOR y ADH6-RUV (Tabla 4). La región 5' de los cebadores ADH6-FOR y ADH6-REV contienen 34 y 33 nucleótidos correspondientes a la secuencia del promotor HXT y el terminador PGK1, respectivamente. Después de la amplificación por PCR, los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa y se purificaron usando un estuche de ensayo de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN). El vector pYEplacHXT fue linealizado usando la endonucleasa de restricción *Bam* HI. Se usó una mezcla que contenía el vector lineal (6,2 KB), el producto de ADH6 de TMB3000 (T-ADH6) o CEN.PK 113-5E (6-ADH6) para transformar CEN.PK 113-5D de *S. cerevisiae* mediante el método de acetato de litio (38). Se hicieron crecer células de levaduras durante una noche en 5 ml de YPD a 30°C. Por la mañana una solución de YPD de 50 ml fue inoculada usando 3 ml del pre-cultivo. El crecimiento se siguió hasta un valor de OD600 = 1,2, cuando las células de levaduras fueron centrifugadas y finalmente puestas en suspensión en 10 ml de agua esterilizada. Se pipeteó un mililitro de células en tubos de micro-centrifugadora y se centrifugaron durante aproximadamente 20 segundos a la velocidad máxima. Después de la separación de la materia sobrenadante, las células se volvieron a poner en suspensión en 1 ml de acetato de litio (LiAc) 100 mM y se incubaron a 30°C durante 10-15 minutos. La suspensión se centrifugó a velocidad máxima durante 30 segundos, la materia sobrenadante se separó y se añadió al sedimento la mezcla de transformación (240 μ l de PEG 50% p/v, 36 μ l de acetato de litio 1,0 M, 52 μ l de 2 mg/ml de ss de NA, 28 μ l de agua esterilizada, 1,0 μ l de 40 ng/ μ l de vector pYEplacHXT y 3 μ l de 40 ng/ μ l de producto de PCR). Después de posteriores incubaciones a 30°C durante 30 minutos y a 42°C durante 20 minutos, la mezcla se centrifugó a velocidad máxima durante 30 segundos y se separó la mezcla de transformación. Las células de levaduras se volvieron a poner en suspensión en 150 μ l de YNB y se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Después de incubar, la mezcla que contenía células se dispuso en placas YNB, que fueron incubadas a 30°C durante 3-4 días. Se construyó una cepa testigo de levadura mediante transformación con el vector pYEplacHXT vacío. Las cepas de levadura transformantes se seleccionaron mediante PCR de colonias usando cebadores ADH6 y capacidad de oxidación de etanol. Se recuperaron plásmidos de dos transformantes (C-ADH6-2 y T-ADH6-2), se amplificaron en DH5 α de *E. coli* y se sometieron a un secuenciado automático

65

ES 2 361 419 T3

Condiciones de cultivo

Matraces agitadas

5 Se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en matraces agitados sin compartimentar de 300 ml. El volumen de medio sintético era de 200 ml con la composición proporcionada en (25) y contenía 13 g de glucosa. El pH se ajustó a 5,5 con NaOH 2 N al comienzo de los cultivos. La velocidad del agitador era de 170 rpm y la temperatura era de 30°C. Los matraces agitados anaeróbicos estaban equipados con colectores de glicerol, mientras que los matraces agitados aeróbicos fueron rociados con aire. El valor de OD₆₂₀ alcanzó 3,0 y el pH se volvió a ajustar a 5,5 y se
10 añadió HMF a una concentración de 1,5 g/l.

Experimentos en bio-reactor

15 Se hicieron fermentaciones discontinuas con la cepa CEN.PK 113-5D y T/ADH6-2. El reactor (bio-reactor Belach BR 0.5, Belach Bioteknik AS, Solna, Suecia) se relleno inicialmente con 300 l de medio sintético según la referencia (25), que contenía 30 g de glucosa. El pH se mantuvo a 5,0 con NaOH 0,75 M y la temperatura a 30°C. El reactor se roció con 300 ml/minuto de nitrógeno y la velocidad del agitador se ajustó a 500 rpm. Cuando la velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono había alcanzado un valor máximo, se añadieron 300 ml de hidrolizado.

20 El hidrolizado usado fue producido a partir de residuo forestal, procedente principalmente de abeto, en un procedimiento de hidrólisis con ácido diluido en dos fases usando ácido sulfúrico como catalizador (19).

Los hidrolizados obtenidos a partir de las dos fases se mezclaron y se almacenaron a 8°C hasta que se usaron.

25 La composición del hidrolizado se proporciona en la Tabla 5.

Medición de la actividad enzimática

30 Se prepararon extractos celulares de cepas que sobreexpresan ADH6 para mediciones de las actividades enzimáticas. Los extractos en bruto se prepararon usando reactivo Y-PER (Pierce, Rockford, IL, USA). El contenido de proteínas en la preparación exenta de células se determinó usando un estuche de ensayo de proteínas micro BCA (Pierce).

35 Las actividades enzimáticas para la oxidación de etanol y la reducción de furfural, 5-hidroximetil-furfural (HMF) y dihidroxi-acetona-fosfato (DHAP) se midieron sobre muestras de extracto celular. La velocidad de oxidación de etanol se determinó verificando la reducción de NAD⁺ fotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. El ensayo enzimático basado en la referencia (37), contenía NAD⁺ 5,0 mM y etanol 1,7 M en tampón de glicina 100 mM a pH 9,0 en cubetas de 1,0 cm de longitud de trayectoria. Las muestras se incubaron a 30°C y la reacción se comenzó mediante la adición de etanol. Las actividades reductoras de HMF y furfural se midieron según la referencia (27). Se diluyeron
40 5-10 μ l de extracto exento de células (usando diluciones diferentes) en 1 ml de tampón de fosfato 100 mM (KH₂PO₄ 50 mM y K₂HPO₄ 50 mM) y se añadió NADH hasta una concentración de 100 μ M. Las muestras se incubaron a 30°C y posteriormente se comenzó la reacción mediante la adición de HMF o furfural hasta una concentración de 100 mM. La oxidación de NADPH se siguió en el cambio de absorbancia a 340 nm. El procedimiento se repitió con NADH como co-factor, pero la cantidad de muestra se aumentó debido a la inferior actividad. El volumen total era todavía
45 de 1,0 ml. Se llevó a cabo el mismo procedimiento cuando se usó DHAP, con la excepción de que se usó solamente una concentración de 0,7 mM de este sustrato. El coeficiente de absorción molar (ϵ) usado para NADH y NADPH fue $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Resultados

50

Selección de transformantes

El gen ADH6 fue amplificado PCR a partir de DNA genómico de CEN.PK o TMB3000 y fue clonado en el vector de levadura pYEplac-HXT, generando vectores pYEplacHXT-C/ADH6 y pYEplacHXT-T/ADH6 respectivamente.
55 Los plásmidos se usaron para la transformación de la cepa CEN.PK113-5D. Se usó PCR de colonias para seleccionar cepas de levaduras que portaban un vector pYEplacHXT-ADH6. Los clones que tenían el gen ADH6 a partir de CEN.PK y TMB3000 se denominaron C/ADH6-m (m= 1, 2, etc.) y T/ADH6-n (n= 1, 2, etc.), respectivamente. Los clones con expresión aumentada de gen ADH6 se seleccionaron entre los transformantes en cuanto a su capacidad aumentada de oxidación de etanol en comparación con la cepa testigo CEN.PK113-5D que portaba el vector vacío
60 (YEplac-HXT (Fig. 8)).

Capacidad de reducción in vitro

65 La capacidad de conversión de HMF y furfural de cepas que sobre-expresan ADH6 fue analizada usando NADH y NADPH como co-factores en ensayos enzimáticos (Fig. 9). Las cepas que sobreexpresaban ADH6 eran capaces de convertir HMF usando NADPH así como NADH como co-factor, pero la actividad usando NADH era claramente inferior que con NADPH. Además de ello, se obtuvieron valores similares para la conversión de HMF y furfural para las cepas C- y T-ADH6, lo que sugiere que no hay diferencias en estructuras/actividad de proteínas entre las cepas

CEN.PK y TMB3000. De hecho, las secuencias génicas de ADH6 de las dos cepas no mostraron ninguna diferencia significativa, excepto en cuanto a una sustitución en el G-203 C-ADH6-2 para E-203 en T-ADH6-2. Cuando se comparó con la cepa testigo CEN.PK113.5D ((pYEplac-HXT), los extractos celulares de cepas que sobreexpresaban muestran una actividad de HMF dependiente de NADH aproximadamente 9 veces mayor, mientras que la reducción de HMF dependiente de ADH6 aumentó más de 100 veces cuando se usó NADPH como co-factor (Fig. 9). Estos resultados confirman informes previos que proponen ADH6 como enzima dependiente de NADPH para la reducción de otros compuestos (38). La reducción de furfural solo fue posible cuando se usó NADPH como co-factor (Fig. 9).

Capacidad de reducción *in vivo*

La conversión de HMF *in vivo* se analizó en medio mínimo usando condiciones aeróbicas y anaeróbicas en matraces agitados. Las cepas que sobreexpresan ADH6 mostraron una absorción de HMF específica superior (3,5-3,9 veces) en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas (tablas 6 y 7). La absorción específica de HMF parecía estar correlacionada con un aumento en la producción de glicerol (Tablas 6 y 7). Con el fin de analizar una actividad directa posible de producto génico ADH6 en la trayectoria metabólica del glicerol, se analizó la capacidad de reducción de C-ADH6-2 y p-ADH6-2DHAP mediante ensayos enzimáticos. Las mediciones de la actividad enzimática no mostraron ningún aumento en la reducción de DHAP (Fig. 10). Posiblemente, la mayor producción de glicerol está indirectamente relacionada con la producción de HMF a través de equilibrios de co-factores celulares.

Tolerancia al hidrolizado en ácido diluido

Se usaron la cepa testigo y una cepa que sobreexpresaba ADH6 a partir de TMB3000 (T/ADH6-2) en fermentaciones discontinuas anaeróbicas con un hidrolizado en ácido diluido (Fig. 11 y 12). La cepa T/ADH6-2 claramente era menos inhibida que la cepa testigo y la CER no disminuyó tan rápidamente para T/ADH6-2 como para a cepa testigo (Fig. 11 y 12). Esto se refleja también en la productividad específica de etanol, que fue un 35% mayor para T/ADH6-2 en comparación con la cepa testigo. La velocidad de absorción específica de HMF se encontró que era cinco veces mayor en la T/ADH6-2 que en la cepa testigo (0,05 g/g h y 0,01 g/g h para T/AHD6-2 y la cepa testigo, respectivamente). La velocidad de absorción específica de furfural, sin embargo, fue la misma (0,02 g/g h) para las dos cepas, mostrando que la tolerancia no está vinculada al furfural sino a la capacidad de conversión de HMF.

Las conclusiones extraídas a partir de esta última serie de experimentos son:

1. Las cepas que sobreexpresan gen ADH6 muestran una mayor conversión de HMF bajo condiciones aeróbicas así como anaeróbicas, en medios sintéticos y en hidrolizados en ácidos diluidos.

2. La conversión de HMF por el producto génico ADH6 es mayormente dependiente de NADPH, ya que los ensayos de la actividad enzimática *in vitro* usando este co-factor muestran una actividad de 100 veces más que las de NADH.

3. Una cepa que sobreexpresa ADH6 tenía una velocidad de fermentación 35% mayor de hidrolizado en ácido diluido sin detoxificar que la correspondiente cepa testigo.

TABLA 1

Descripción de las cinco cepas diferentes de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Referencia
CBS 8066	Una cepa de laboratorio diploide ampliamente usada	(21)
Levadura panadería	de Levadura disponible en el comercio, obtenida de la empresa de levaduras de panadería Sueca, Jästbolaget AB, Rotebro, Suecia	-
TMB3000	Una cepa aislada a partir de una planta de fermentación de líquido de sulfito agotado	(32)
TMB3006	Una cepa genéticamente modificada basada en TMB3000. Expresa los genes heterólogos de XYL1 y XYL2 a partir de <i>P. stipitis</i> y sobreexpresa el gen XKS1 a partir de <i>S. cerevisiae</i>	(17)

ES 2 361 419 T3

TABLA 2

Composición de hidrolizado. El hidrolizado usado como sustrato en las fermentaciones se produjo a partir de residuo forestal, procedente principalmente de abeto, en un procedimiento de hidrólisis en ácido diluido en dos fases usando ácido sulfúrico. La hidrólisis se realizó como se describe por Nilsson *et al.*

Compuesto	Concentración (g/l)
Glucosa	16,2
Manosa	13,4
Galactosa	3,2
Xilosa	6,1
Arabinosa	1,1
Ácido acético	1,5
Furfural	0,2
HMF	1,6

TABLA 3

Productividad media de etanol CFU y velocidades de crecimiento específicas obtenidas en cultivos discontinuos y de alimentación discontinua usando hidrolizados en ácidos diluidos como fuente de carbono

	Modo de cultivo	CBS 8066	Levadura de panadería	TMB3000	TMB3006
Productividad específica de etanol, re (g/g h)	Discontinuo	0,13	0,19	0,36	0,30
	Alimentación discontinua	0,30	0,31	0,61	0,66
CFU (%) ²	Discontinuo	16	4	77	100
	Alimentación discontinua	78	100	95	81
Velocidad de crecimiento específico media, μ (h ⁻¹)	Discontinuo	0	0	0	<0,01
	Alimentación discontinua	0	0,07	0,12	0,12

¹calculada como la productividad específica media de etanol durante la fermentación de hidrolizado, hasta que la CER disminuyó hasta menos de 5 mmol/h.

²valor de CFU tomado 2-8 horas después del comienzo de la alimentación de hidrolizado (%)

ES 2 361 419 T3

TABLA 4

Cebadores para amplificación de ADH6

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño
DH6- FOR	TTAATTTTAATCAAAAAAGGATCCCCGGGCTGCAATGTCTTATCCTGAGAAATTTGAAGG	0 bp
DH6- REV	CACCACCAGTAGAGACATGGGAGATCTAGAATTCCTAGTCTGAAAATTCTTTGTCGTAGC	0 pb

Letras de las casillas superiores: secuencias homólogas para promotor HXT en cebador ADH6-FOR y terminador PGK en ADH6-REV, respectivamente.

TABLA 5

Composición de hidrolizado. El hidrolizado se produjo en una hidrólisis en ácido diluido en dos fases de residuos forestales, principalmente de abeto

Compuesto	Concentración(g/l)
Glucosa	23,7
Manosa	13,6
Galactosa	3,0
Xilosa	5,2
HMF	2,0
Furfural	0,6
Ácido acético	1,6

Tabla 6 - Cultivos anaeróbicos de clones de ADH6

Cepa	Velocidad de crecimiento específico (h^{-1}) sin HMF	Velocidad de crecimiento específico (h^{-1}) con 1,5 g/l de HMF	Absorción específica de HMF ($g/g h$)	Rendimiento de glicerol (g/g)	Rendimiento de biomasa (g/g)
CEN.PK113	0,38	0,21	0,12	0,072	0,059
TMB3000	0,45	0,25	0,31	0,086	0,074
C/ADH2-2	0,34	0,21	0,42	0,101	0,064
T/ADH6-2	0,34	0,21	0,44	0,097	0,055

Tabla 7 - Cultivos aeróbicos de clones de ADH6

Cepa	Velocidad de crecimiento específico (h^{-1}) sin HMF	Velocidad de crecimiento específico (h^{-1}) con 1,5 g/l de HMF	Absorción específica de HMF ($g/g h$)	Rendimiento de glicerol (g/g)	Rendimiento de biomasa (g/g)
CEN.PK113	0,43	0,29	0,20	0,049	0,099
TMB3000	0,44	0,33	0,29	0,057	0,092
C/ADH2-2	0,35	0,32	0,78	0,085	0,077
T/ADH6-2	0,37	0,33	0,80	0,083	0,078

Referencias

1. **Bergeron, P. W., Wright, J. D. and Wyman, C. E.**, Dilute acid hydrolysis of biomass for ethanol production. 1989, 12 1277-1296
- 5 2. **Galbe, M. and Zacchi, G.**, A review of the production of ethanol from softwood. 2002, 59 618-628
3. **Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. and Nilvebrant, N.**, The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. 1999, 24 151-159
- 10 4. **Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N. O. and Jönsson, L.**, Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. 2000, 84-86 617-631
- 15 5. **Palmqvist, E., Almeida, J. and Hahn-Hägerdal, B.**, Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. 1999, 62 447-457
6. **Taherzadeh, M., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C. and Lidén, G.**, Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. 1997, 36 4659-4665
- 20 7. **Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C. and Liden, G.**, Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. 2000, 53 701-708
8. **Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B.**, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. 1996, 18 312-331
- 25 9. **Taherzadeh, M., Gustafsson, L., Niklasson, C. and Lidén, G.**, Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. 1999, 87 169-174
- 30 10. **Villa, G., Bartroli, R., Lopez, R., Guerra, M., Enrique, M., Penas, M., Rodriguez, E., Redondo, D., Iglesias, I. and Diaz, M.**, Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. 1992, 12 509-512
11. **Skoog, K. and Hahn-Hägerdal, B.**, Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. 1990, 56 3389-3394
- 35 12. **Ho, N. W. and Chang, S.**, Cloning of yeast xylulokinase gene by complementation of *Escherichia coli* and yeast mutations. 1989, 11 417-421
- 40 13. **Jeppsson, H., Yu, S. and Hahn-Hägerdal, B.**, Xylulose and glucose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat culture. 1996, 62 1705-1709
14. **Ho, N., Chen, Z. and Brainard, A.**, Genetically engineered *Saccharomyces yeast* capable of effective cofermentation of glucose and xylose. 1998, 64 1852-1859
- 45 15. **Johansson, B., Christensson, C., Hobley, T. and Hahn-Hägerdal, B.**, Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. 2001, 67 4249-4255
- 50 16. **Toivari, M., Aristidou, A., Ruohonen, L. and Penttillä, M.**, Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. 2001, 3 236-249
17. **Johansson, B.**, Metabolic engineering of the pentose phosphate pathway of xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. 2001,
- 55 18. **Nilsson, A., Taherzadeh, M. and Lidén, G.**, On-line estimation of sugar concentration for control of fed-batch fermentation of lignocellulosic hydrolyzates by *Saccharomyces cerevisiae*. 2002, 25 183-191
19. **Nilsson, A., Taherzadeh, M. J. and Liden, G.**, Use of dynamic step response for control of fed-batch conversion of lignocellulosic hydrolyzates to ethanol. 2001, 89 41-53
- 60 20. **Taherzadeh, M. J., Niklasson, C. and Liden, G.**, On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. 2000, 69 330-338
- 65 21. **Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. and van Dijken, J. P.**, Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. 1990, 136 395-403

22. **Martin, C.** and **Jönsson, L.**, Comparison of resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. 2003, 32 386-395
23. **Busturia, A.** and **Lagunas, R.**, Catabolic inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*, 1986, 132 379-385
24. **Meinander, N.**, **Boels, I.** and **Hahn-Hägerdal, B.**, Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without overexpressing TAL1. 1999, 68 79-87
25. **Taherzadeh, M.**, **Lidén, G.**, **Gustafsson, L.** and **Niklasson, C.**, The effects of pantothenate deficiency and acetate addition on anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. 1996, 46 176-182
26. **Björkqvist, S.**, **Ansel, R.**, **Alder, R.** and **Lidén, G.**, Glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae* grown under aerobic and anaerobic conditions. 1997, 63 128-132
27. **Wahlbom, C.** and **Hahn-Hägerdal, B.**, **Furfural**, 5-hydroxymethyl furfural and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. 2002, 78 172-178
28. **Bruinenberg, P.**, **Van Dijken, J.** and **Scheffers, W.**, An enzymatic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. 1983, 129 965-971
29. **Taherzadeh, M.**, **Niklasson, C.** and **Liden, G.**, Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. 1999, 69 59-66
30. **Chung, I. S.**, and **Lee, Y. Y.**, Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high-level yeast inocula. 1985, 27 308-315
31. **Nemirovskii, V.** and **Kostenko, V.**, Transformation of yeast growth inhibitors, which occurs during biochemical processing of wood hydrolyzates. 1991, 1 16-17
32. **Linden, T.**, **Peetre, J.** and **Hahn-Hägerdal, B.**, Isolation and characterisation of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strain of *S. cerevisiae* from a spent sulphite liquor fermentation plant. 1992, 15 103-121
33. **Diaz, D.**, **Villa, P.**, **Guerra, M.**, **Rodriguez, E.**, **Redondo, D.** and **Martinez, A.**, Conversion of furfural into furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae* 354, 1992, 12
34. **Modig, T.**, **Lidén, G.** and **Taherzadeh, M.**, Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. 2002, 363 769-776
35. **Larsson, S.**, Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance. 2000,
36. **Lagunas, R.**, **Dominguez, C.**, **Busturia, A.** and **Saez, M.**, Mechanisms of appearance of the pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. 1982, Oct. 19-25
37. Methods in Enzymatic Analysis 1974. H U Bergmeyer (Ed.) Vol 1, p. 428-429.
38. **Giertz, R. D.**, and **R. A. Woods.** 1998. in "Methods in Microbiology". Vol. 26 (AJP Brown and M F Tuite, eds) p. 53. *Academic Press*, San Diego.
39. **Larroy, C.**, **M. R. Fernandez, G. E. X. Pares,** and **J. A. Biosca.** 2002. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependant alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem J.* 361:163-172.

Leyendas de las figuras

Fig. 1. Después de una tanda inicial de medios sintéticos, se añadieron 1,5 litros al reactor. *Fila superior*: fermentaciones discontinuas en las que el hidrolizado fue añadido con velocidad máxima (aproximadamente 2.000 ml/h). *Fila inferior*: alimentación discontinua en la que la alimentación discontinua fue controlada mediante el programa previamente desarrollado (véase la sección de Materiales y Métodos). Se realizaron fermentaciones tanto discontinuas como de alimentación discontinua con A: CBS 8066, B: Levadura de panadería, C: TMB3000, D: TMB3006. *Columna izquierda*: Velocidad de desprendimiento de carbono (CER). *Columna derecha*: etanol y velocidad de alimentación. La cantidad de biomasa formada y las concentraciones de HMF y furfural se pueden observar en la Fig.2.

Fig. 2. Fermentaciones discontinuas y de alimentación discontinua con A: CBS 8066, B: levadura de panadería, C: TMB3000, D: TMB3006. La CER, velocidad de alimentación y cantidad de etanol formado a partir de estos experimentos se pueden observar en la Fig. 1. *Fila superior*: fermentaciones discontinuas en las que el hidrolizado

ES 2 361 419 T3

fue añadido con velocidad máxima (aproximadamente 2.000 ml/h). *Fila inferior*: alimentación discontinua en la que la velocidad de alimentación fue controlada mediante el programa previamente desarrollado (véase la sección de Materiales y Métodos). *Columna izquierda*: biomasa. *Columna derecha*: concentraciones de HMF y furfural.

5 Fig. 3. Fermentaciones con TMB3006. A: fermentación discontinua con 1,5 litro de hidrolizado y una velocidad de alimentación máxima de aproximadamente 2.000 ml/h. B: alimentación discontinua con la estrategia de control previamente desarrollada. C: fermentación de alimentación discontinua con una baja velocidad de alimentación. Después de 17 horas del comienzo de la tanda inicial la velocidad de alimentación se ajustó a 25 ml/h. A las 48 horas, la velocidad de alimentación se disminuyó hasta 12,5 ml/h hasta que se habían añadido totalmente 850 ml de hidrolizado.
10 *Columna derecha*: concentración de xilosa y xilitol. *Columna izquierda*: consumo de xilosa.

Fig. 4. Mediciones de actividades enzimáticas a partir de alimentaciones discontinuas con CBS 8066 (Barras blancas) y TMB3000 (barras grises). A: actividad enzimática para la conversión de furfural. B: actividad enzimática para la conversión de HMF. *Fila superior*: NADH usada como el co-factor. *Fila inferior*: NADPH usada como el co-factor. Tiempo = 0, h corresponde al comienzo de la fase de alimentación discontinua.
15

Fig. 5. Actividad de ADH medida en fermentaciones de alimentación discontinua con CBS 8066 (barras blancas) y TMB3000 (barras grises). Tiempo = 0, h corresponde al comienzo de la fase de alimentación discontinua.

20 Fig. 6. Expresión en series para diferentes genes. Barras negras: mRNA a partir de TMB3000, barras con rayas: mRNA a partir de TMB3000 crecida en medios sintéticos complementados con 0,5 g/l de HMF, Barras grises: mRNA a partir de CBS 8066, Barras blancas: mRNA a partir de CBS 8066 crecido en medios sintéticos complementados con 0,5 g/l de HMF.

25 Fig. 7. Velocidades de conversiones enzimáticas de extractos exentos de células a partir de la colección de Exclone que sobreexpresan genes diferentes. Barras negras: velocidad de conversión de furfural con NADH, barras de rayas: velocidad de conversión de furfural con NADPH, barras grises: velocidad de conversión de HMF con NADH, barras blancas: velocidad de conversión de HMF con NADPH.

30 Fig. 8. Actividad de oxidación específica de etanol (en mU/mg de proteína) a partir de extractos celulares usando NAD⁺ como co-factor. 113-5D = CEN.PK 113-5D con vector vacío YEplac-HXT, C/ADH6-m = clon m con gen ADH6 a partir de cepa CEN.PK sobreexpresada, T/ADH6-n = clon n con gen ADH6 a partir de cepa TMB3000 sobreexpresada.

35 Fig. 9. Actividades enzimáticas específicas en extractos celulares en bruto a partir de la cepa testigo CEN.PK 113-5D (YEplac-HXT) y cepas que sobreexpresan ADH6 C/ADH-2 y T/ADH6.2. A: conversión de furfural con NADH como co-factor. B: conversión de HMF con NADH como co-factor. C: conversión de furfural con NADPH como co-factor. D: conversión de HMF con NADPH como co-factor.

40 Fig. 10. Actividad de reducción específica de DHAP en extractos celulares en bruto para la cepa testigo CEN.PK 113-5D (YEplac-HXT), las cepas que sobreexpresan ADH6 C/ADH6-2 y T/ADH6-2 y la cepa TMB3000 usando NADH (A) y NADPH (B) como co-factor.

45 Fig. 11. Fermentación discontinua de un hidrolizado en ácido diluido con la cepa control CEN.PK 113-5D (YEplac-HXT). Una fecha indica la adición de hidrolizado.

Fig. 12. Fermentación discontinua de un hidrolizado en ácido diluido con cepa T/ADH6-2. La flecha indica la adición de hidrolizado.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* productora de etanol CEN.PK 113-5D, que es capaz de crecer y producir etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos, que comprende compuestos inhibidores del crecimiento del grupo furfural y 5-hidroxi-metil-furfural, en una fermentación discontinua, de alimentación discontinua o continua, cepa que está sobre-regulada y/o sobreexpresada con respecto al gen ADH6, en que la alcohol deshidrogenasa es dependiente de NADPH.

10 2. Uso de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* productora de etanol para crecer y producir etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos, que comprende compuestos inhibidores del crecimiento del grupo furfural y 5-hidroxi-metil-furfural en una fermentación discontinua, de alimentación discontinua o continua, cepa que está sobre-regulada y/o sobreexpresada con respecto al gen ADH6, en que la alcohol deshidrogenasa es dependiente de NADPH.

15 3. Uso según la reivindicación 2, en que dicha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es CEN.PK 113-5D.

4. Uso según la reivindicación 2 ó 3, para la reducción furfural.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

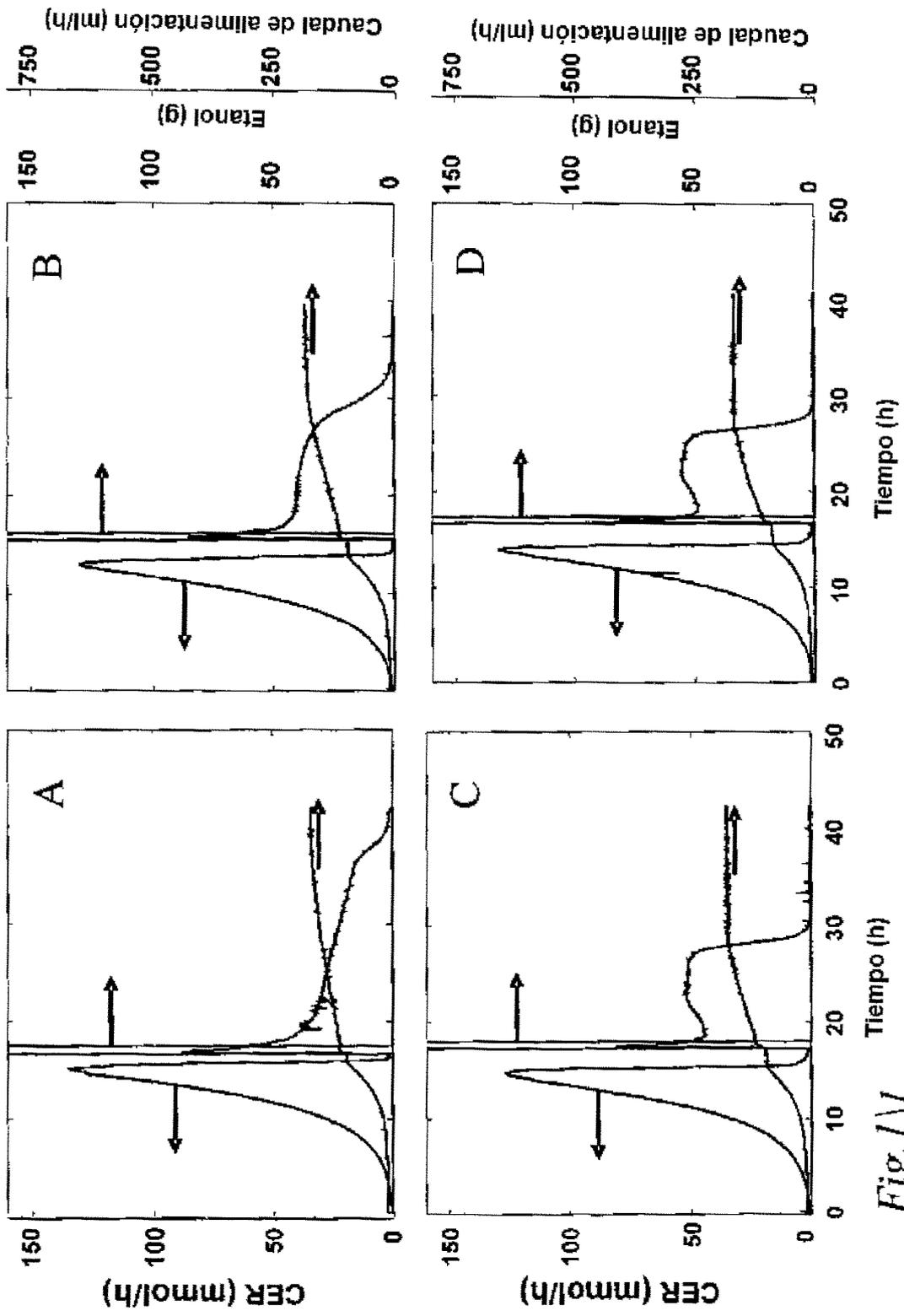


Fig. 1 | 1

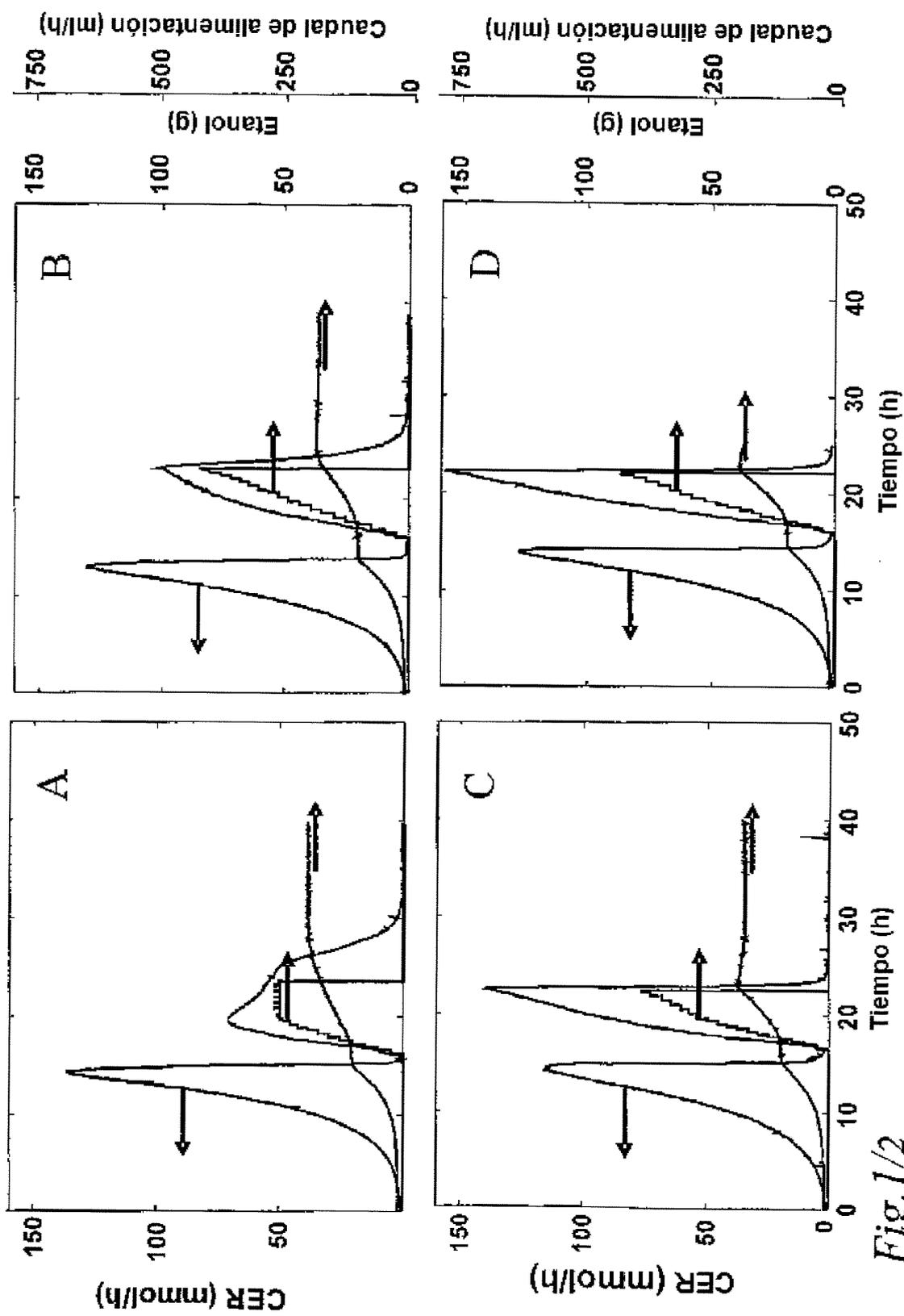


Fig. I/2

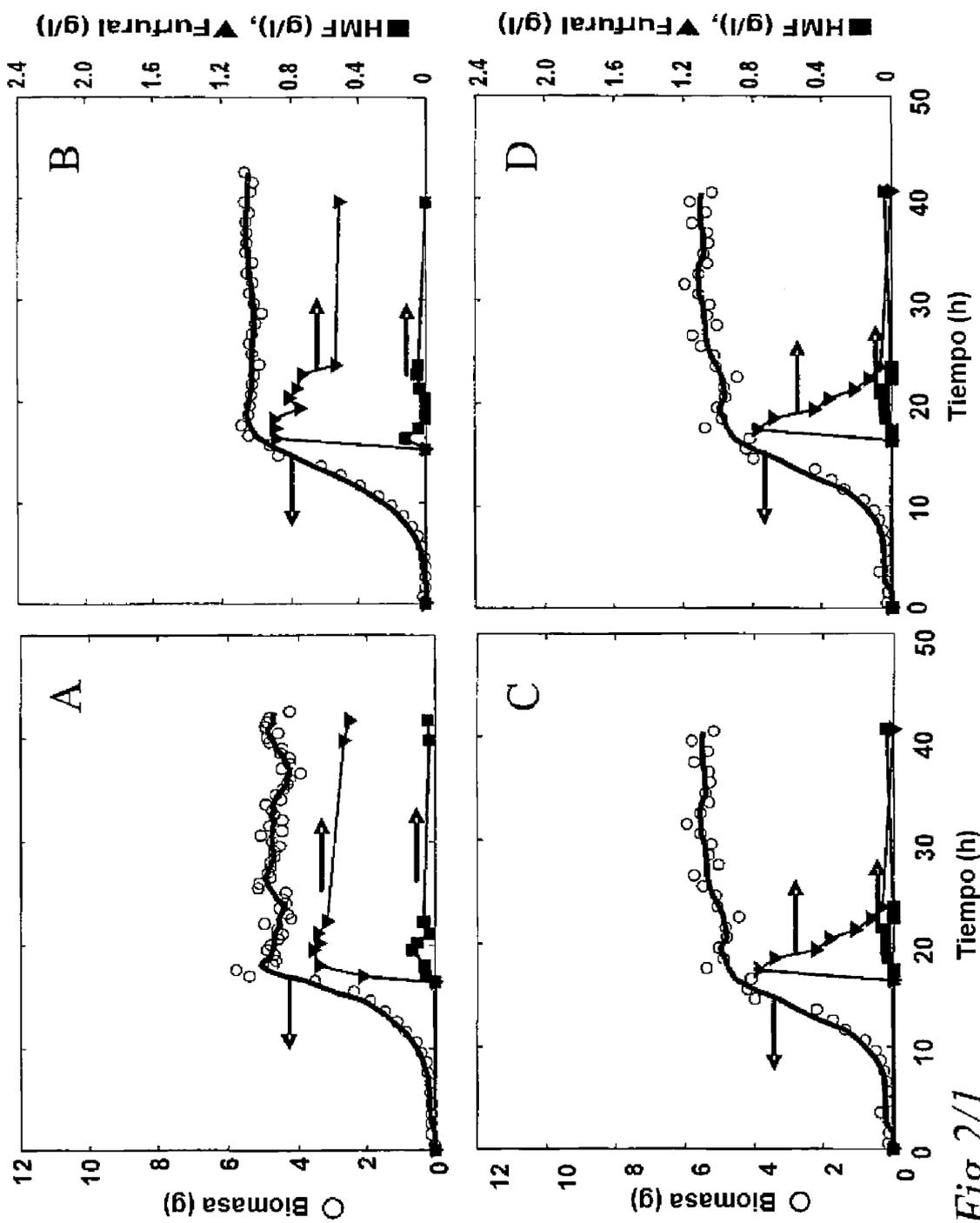


Fig.2/1

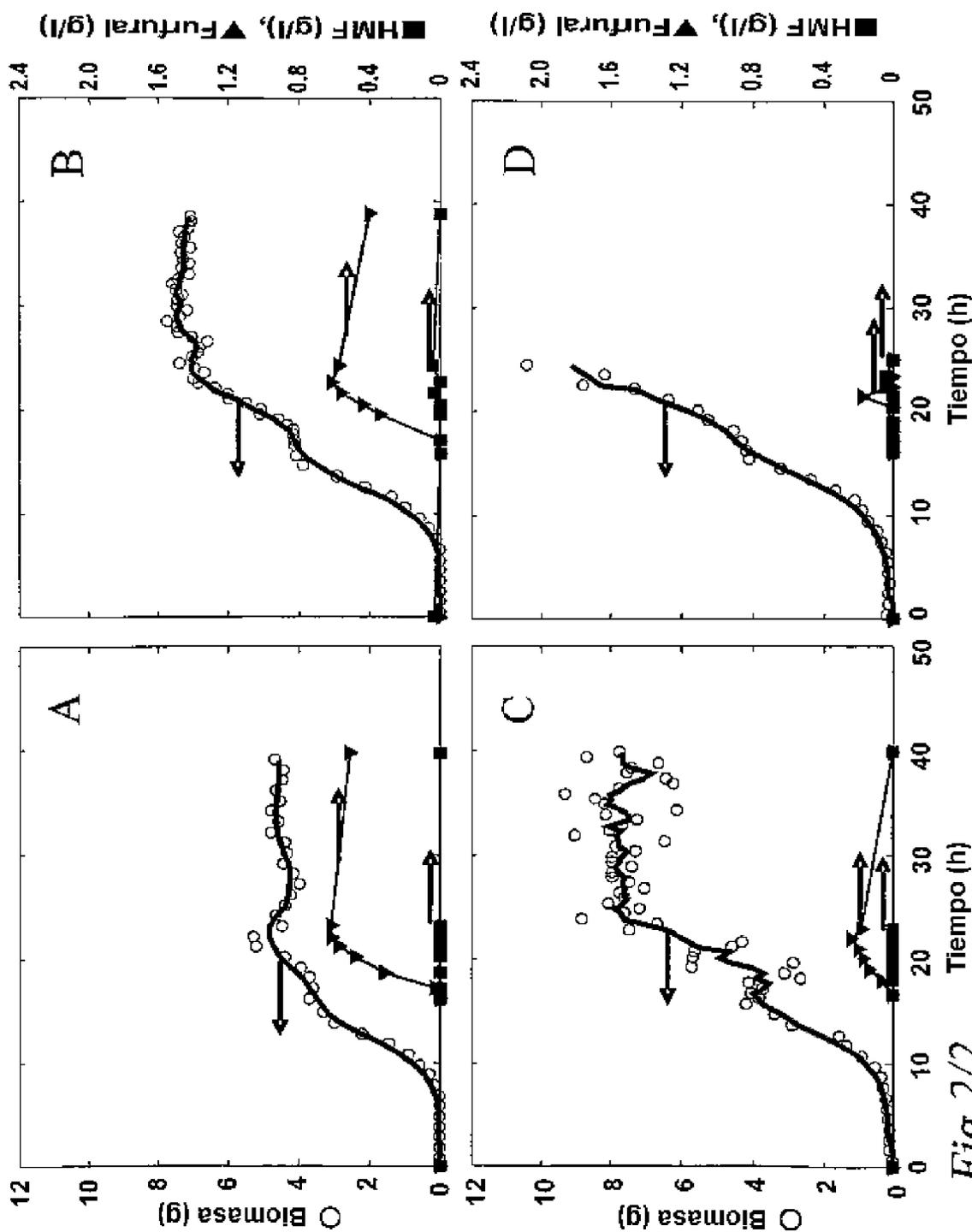


Fig. 2/2

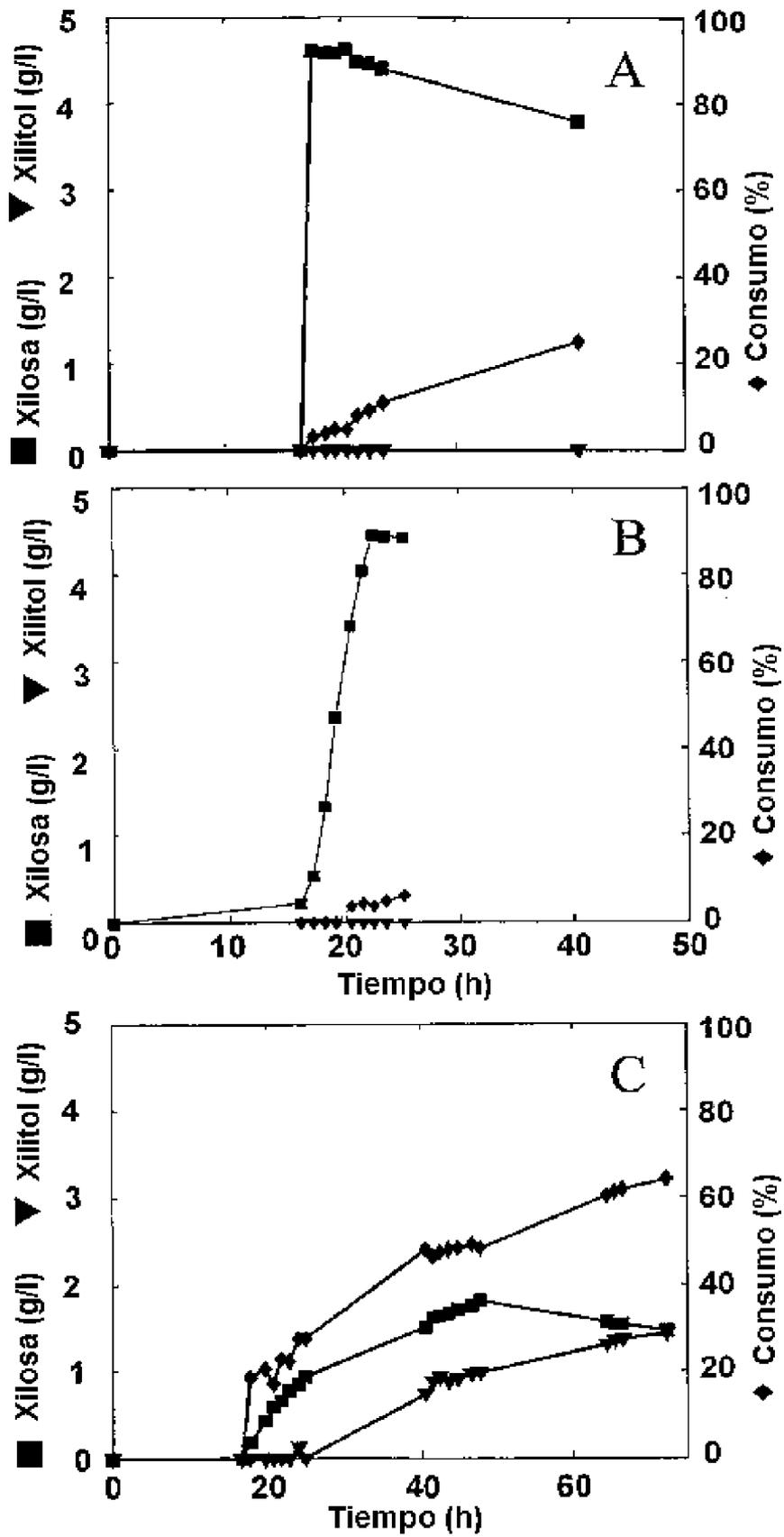


Fig.3

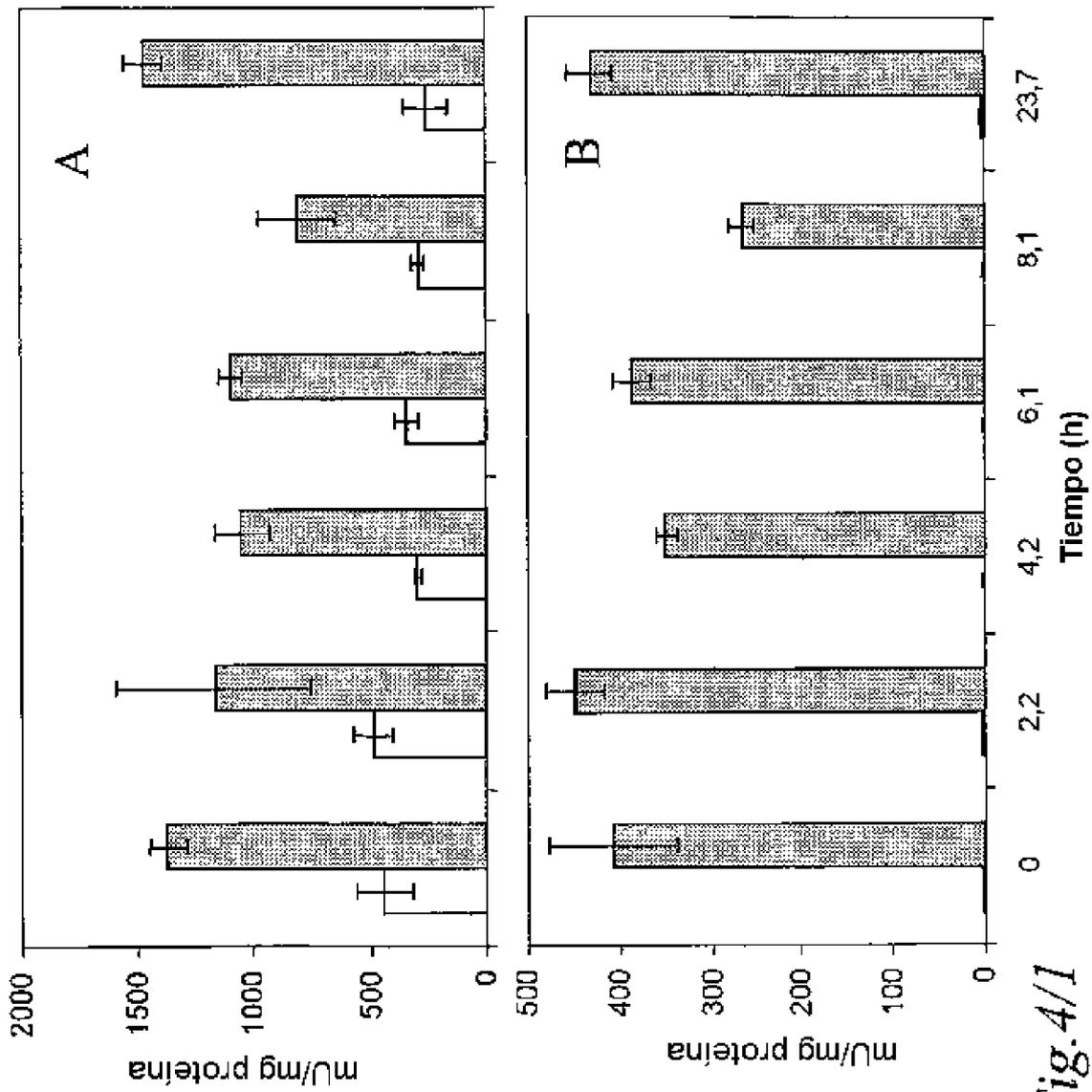


Fig.4/1

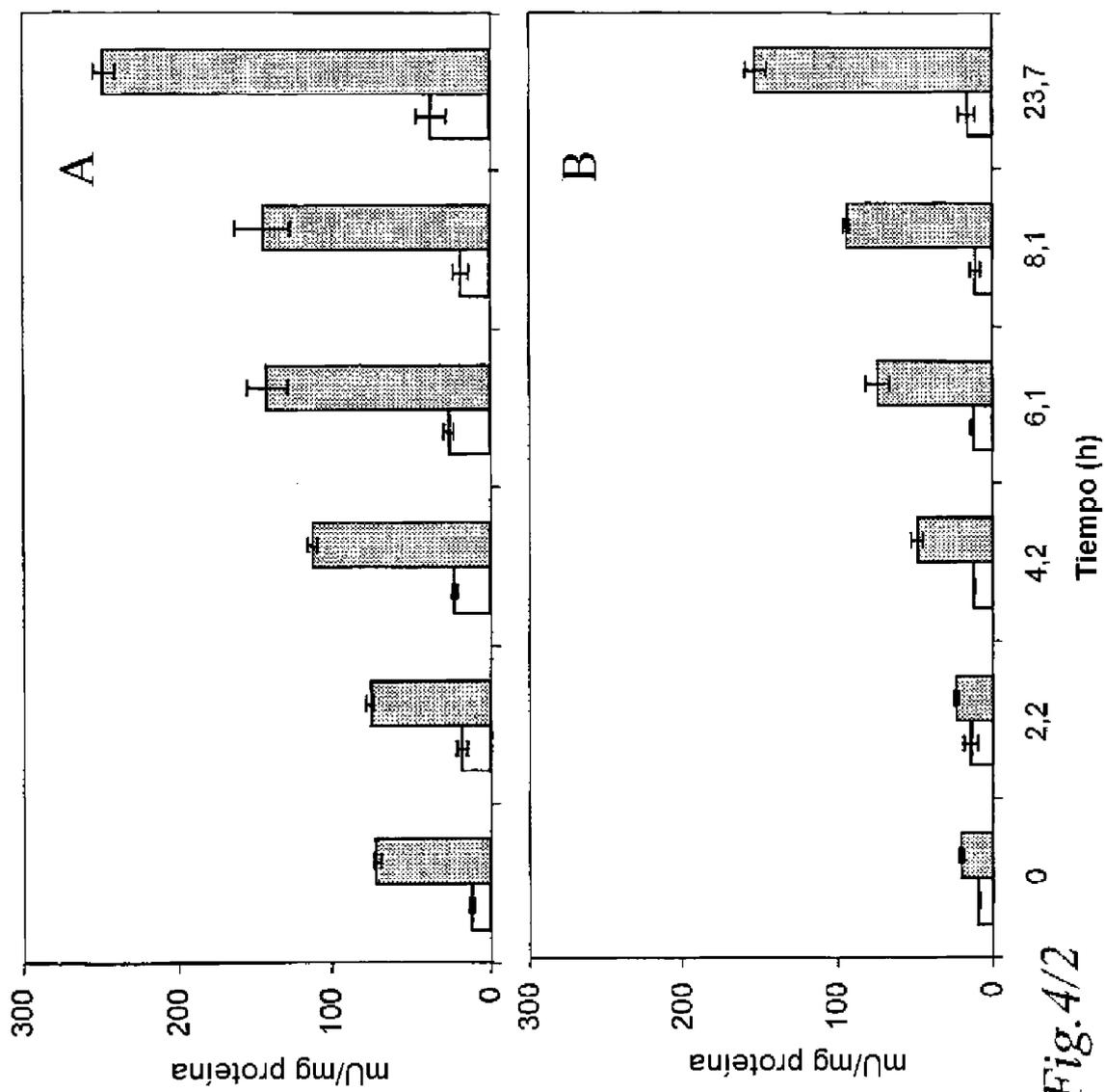


Fig. 4/2

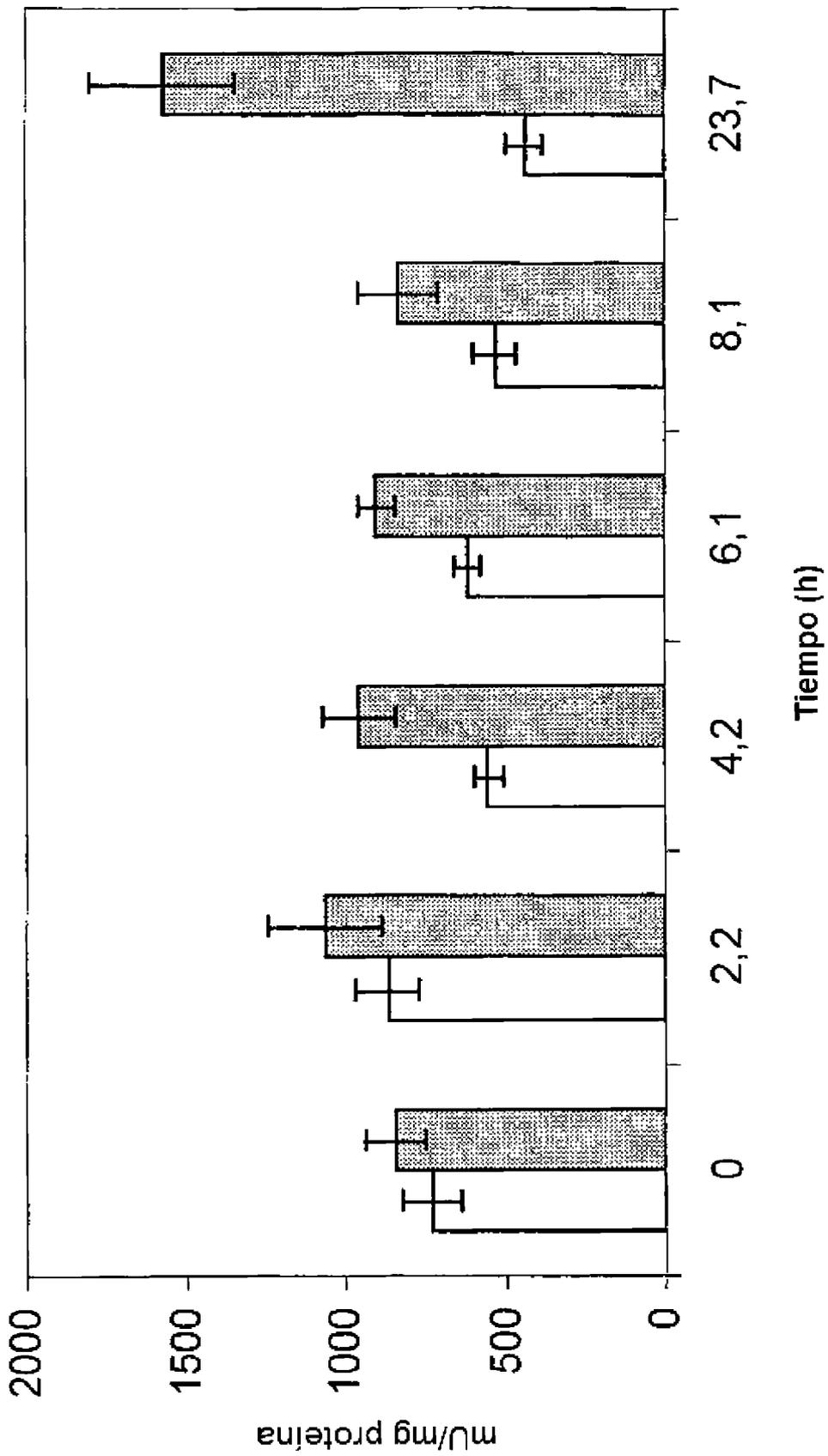


Fig.5

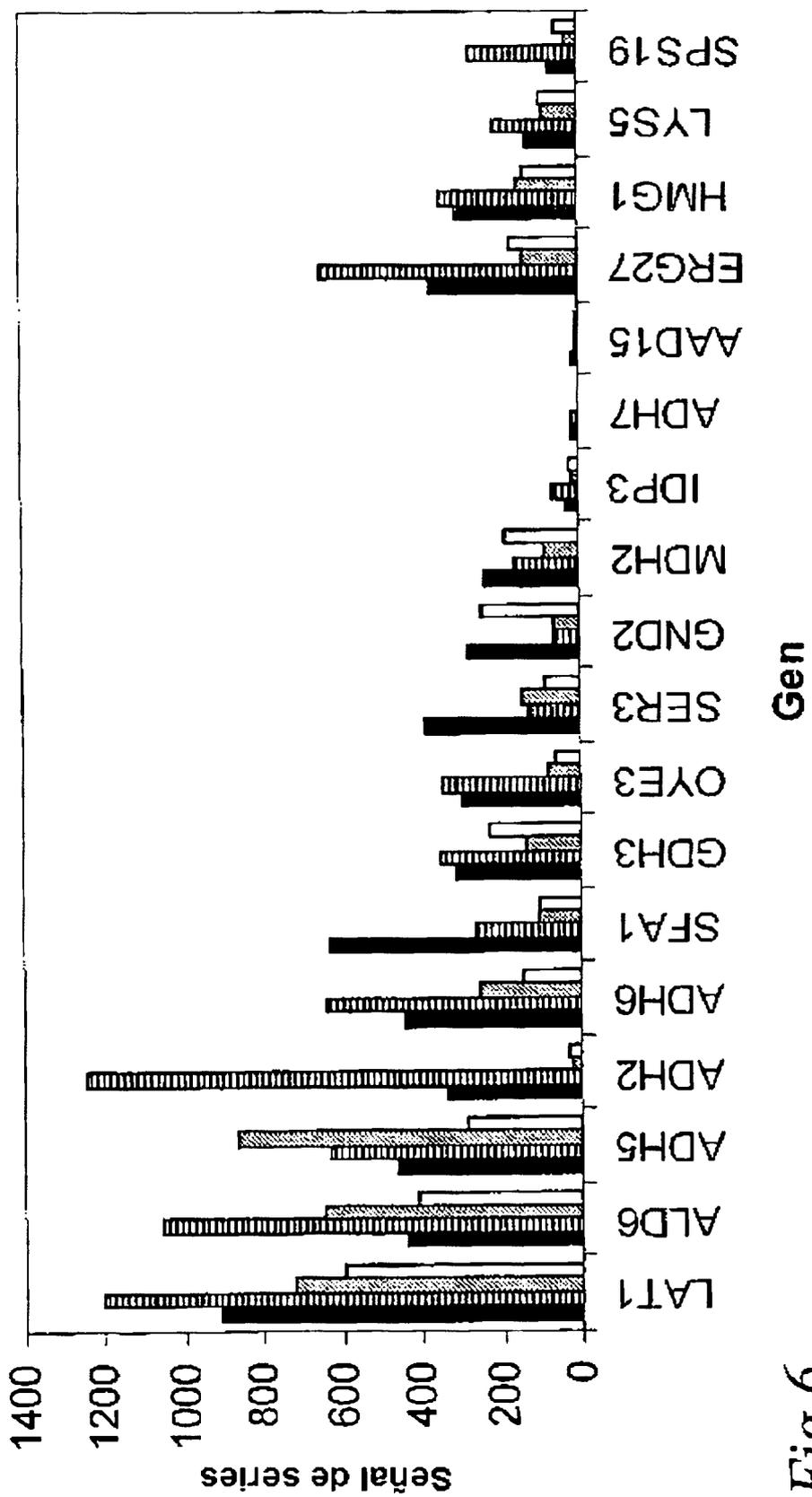


Fig.6

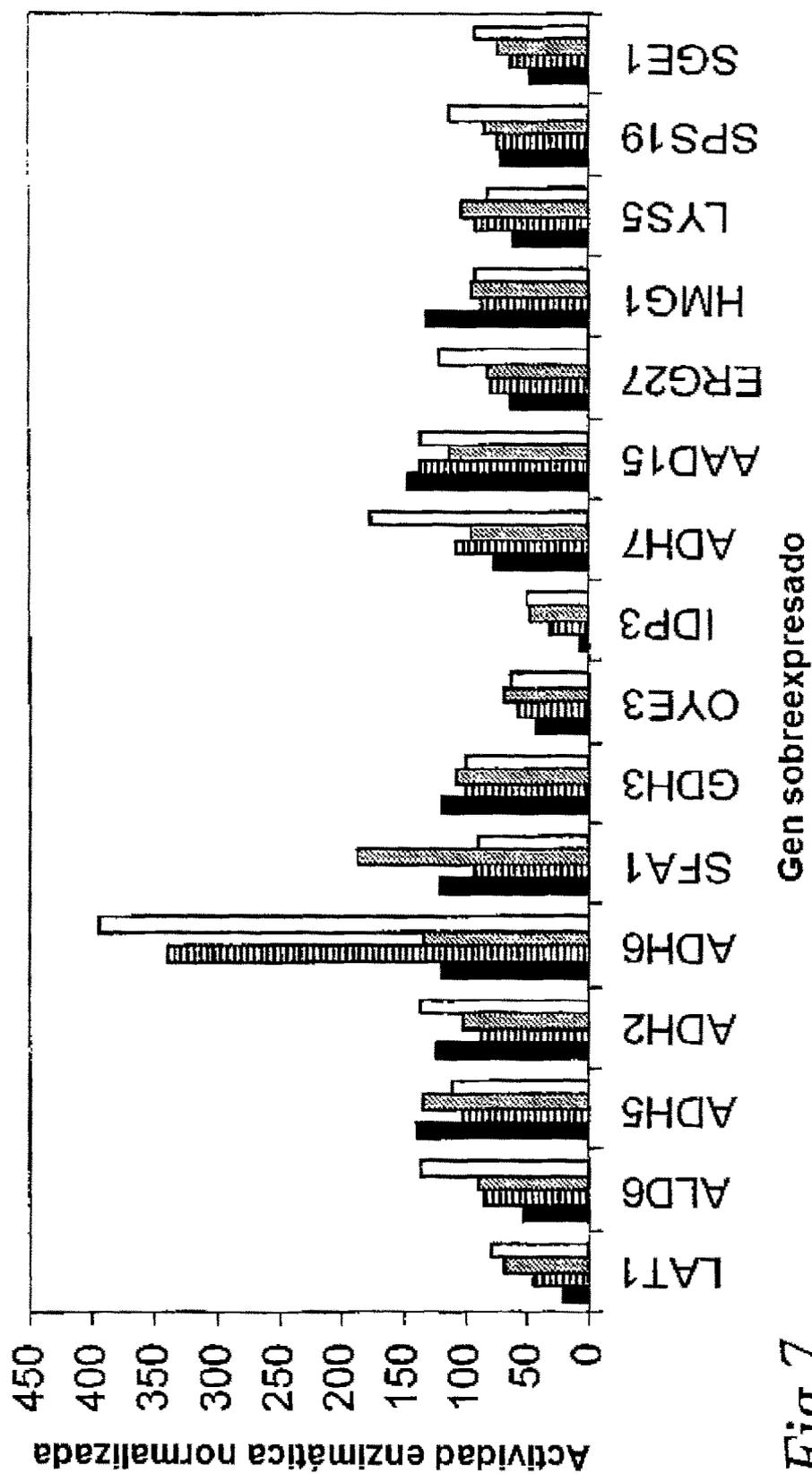


Fig. 7

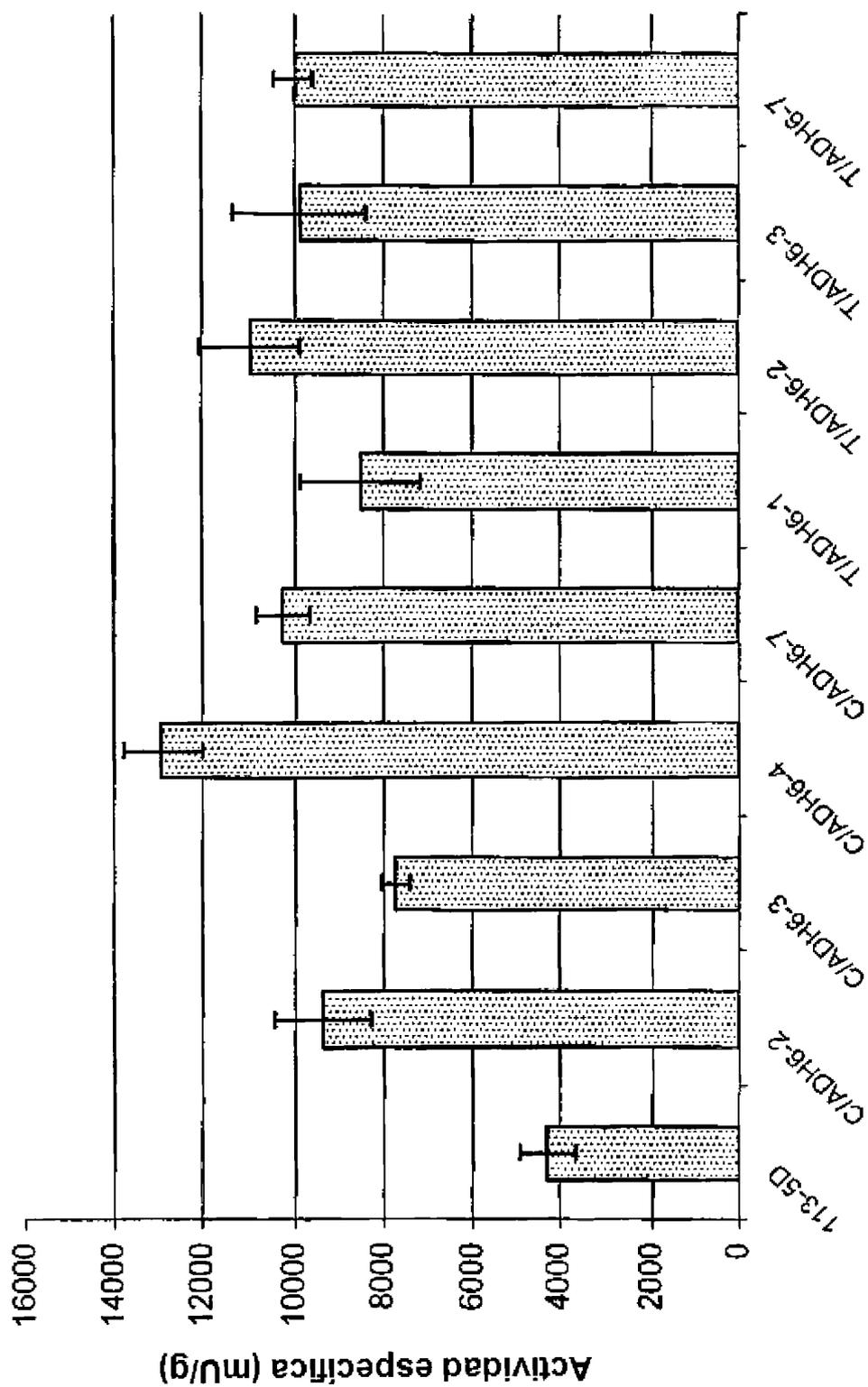


Fig.8

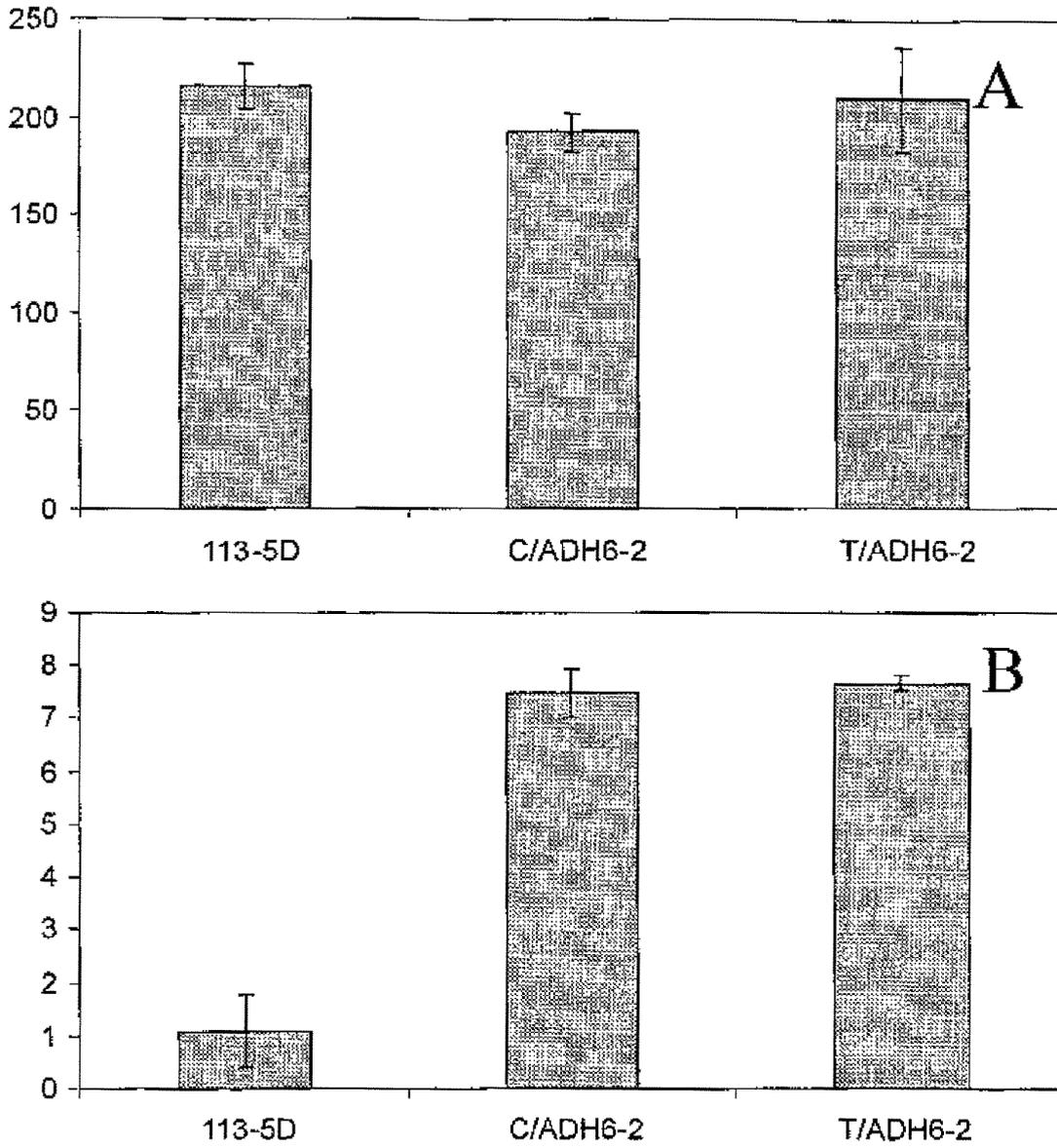


Fig.9/1

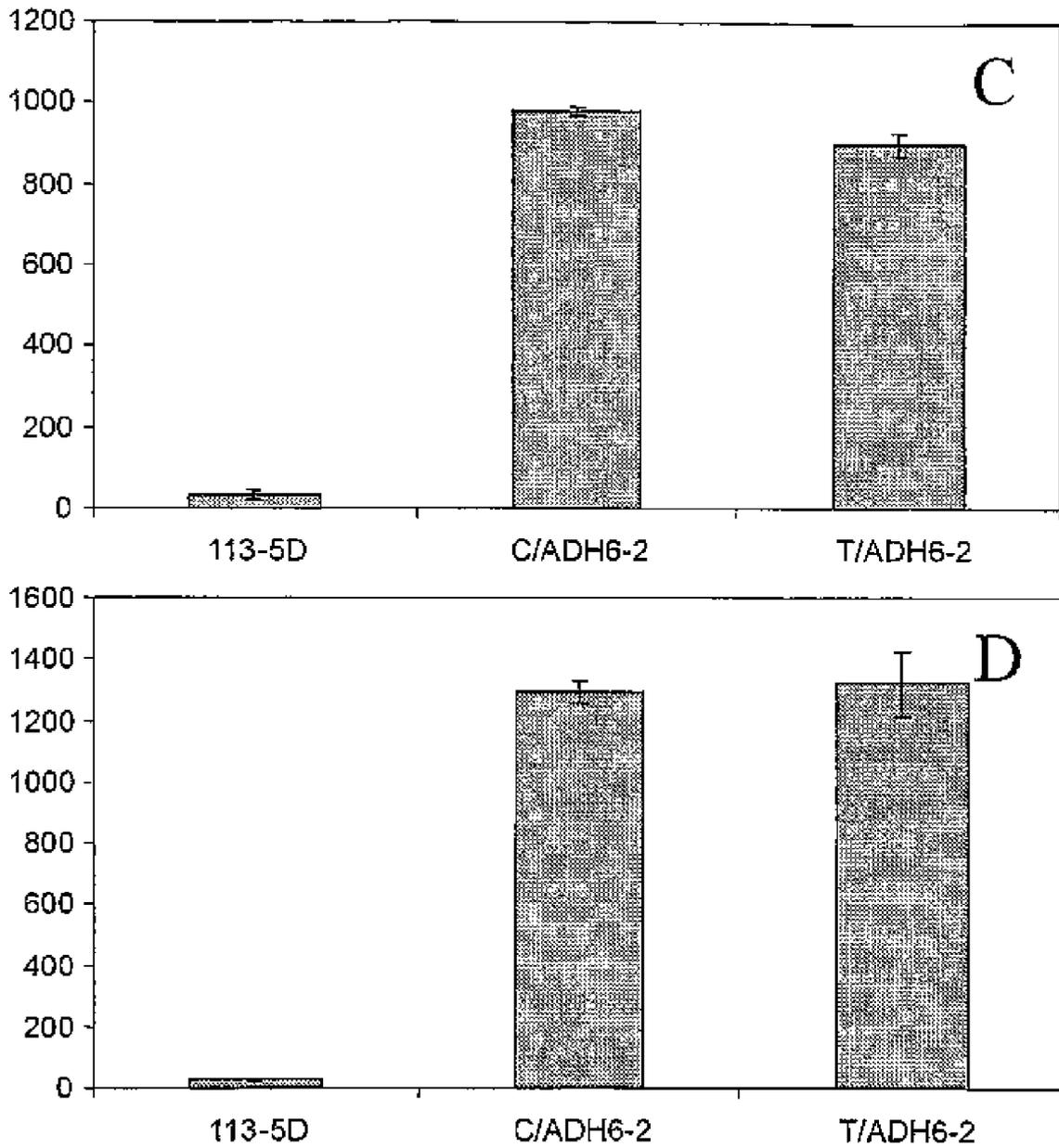


Fig. 9/2

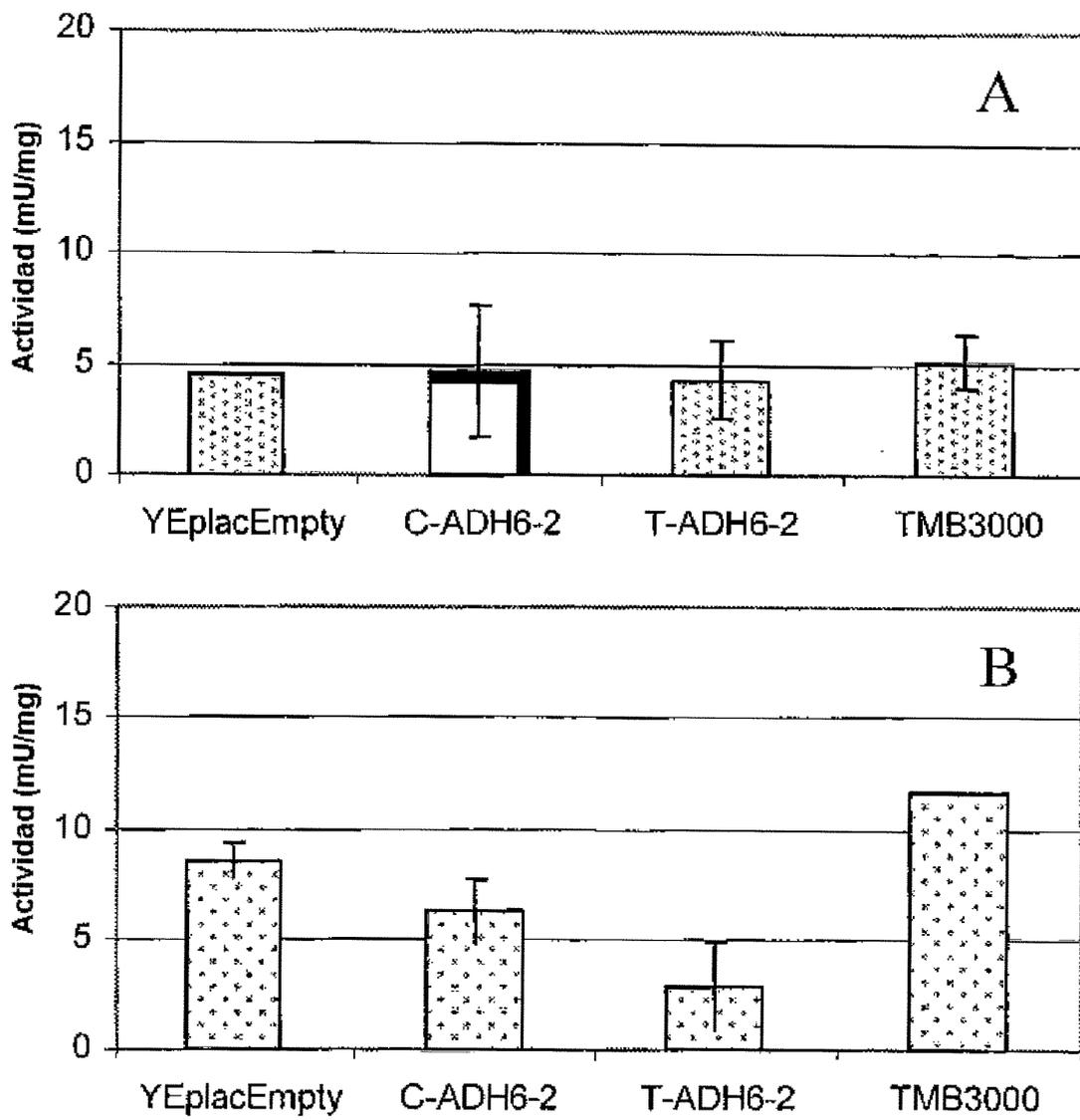


Fig.10

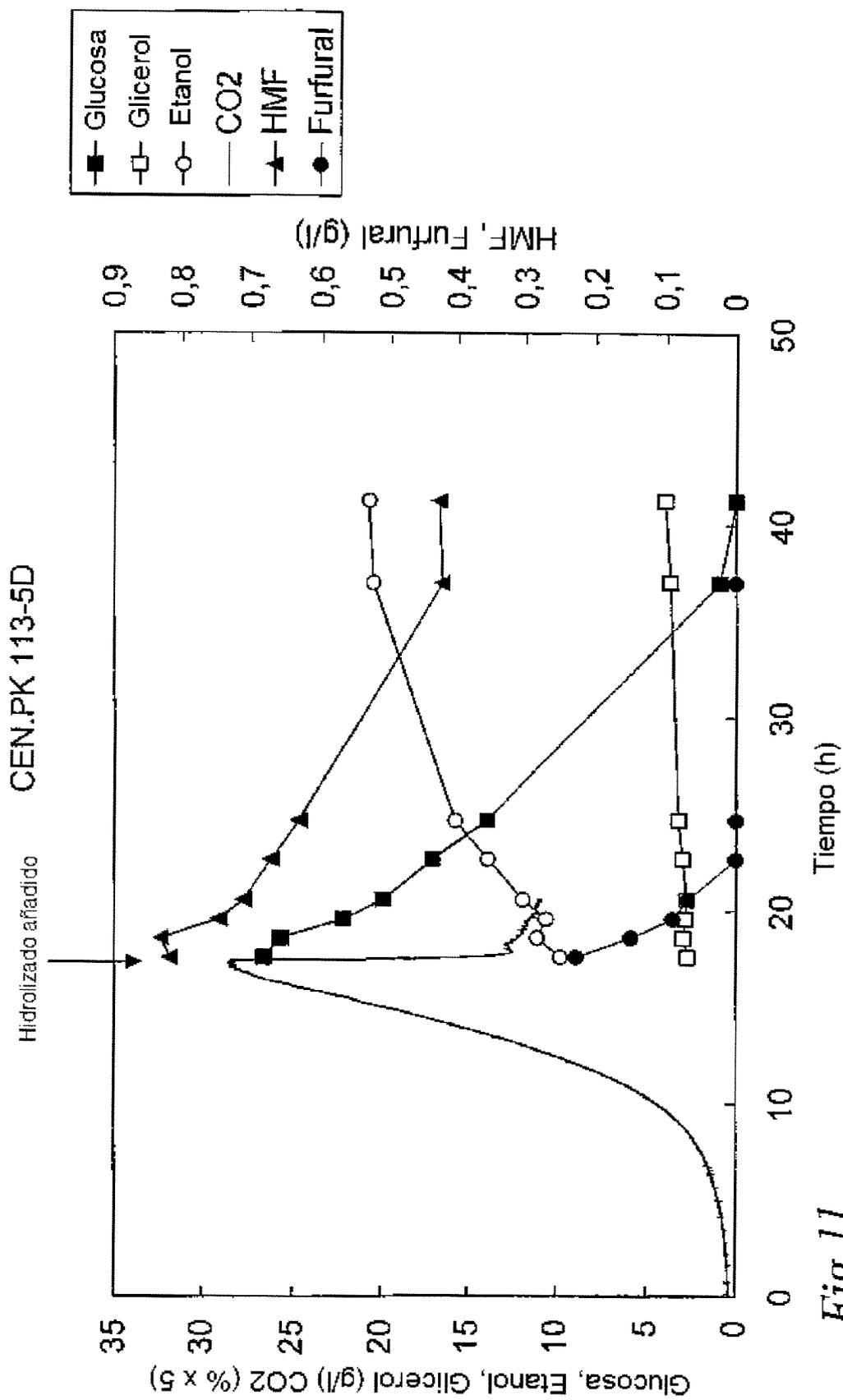


Fig. 11

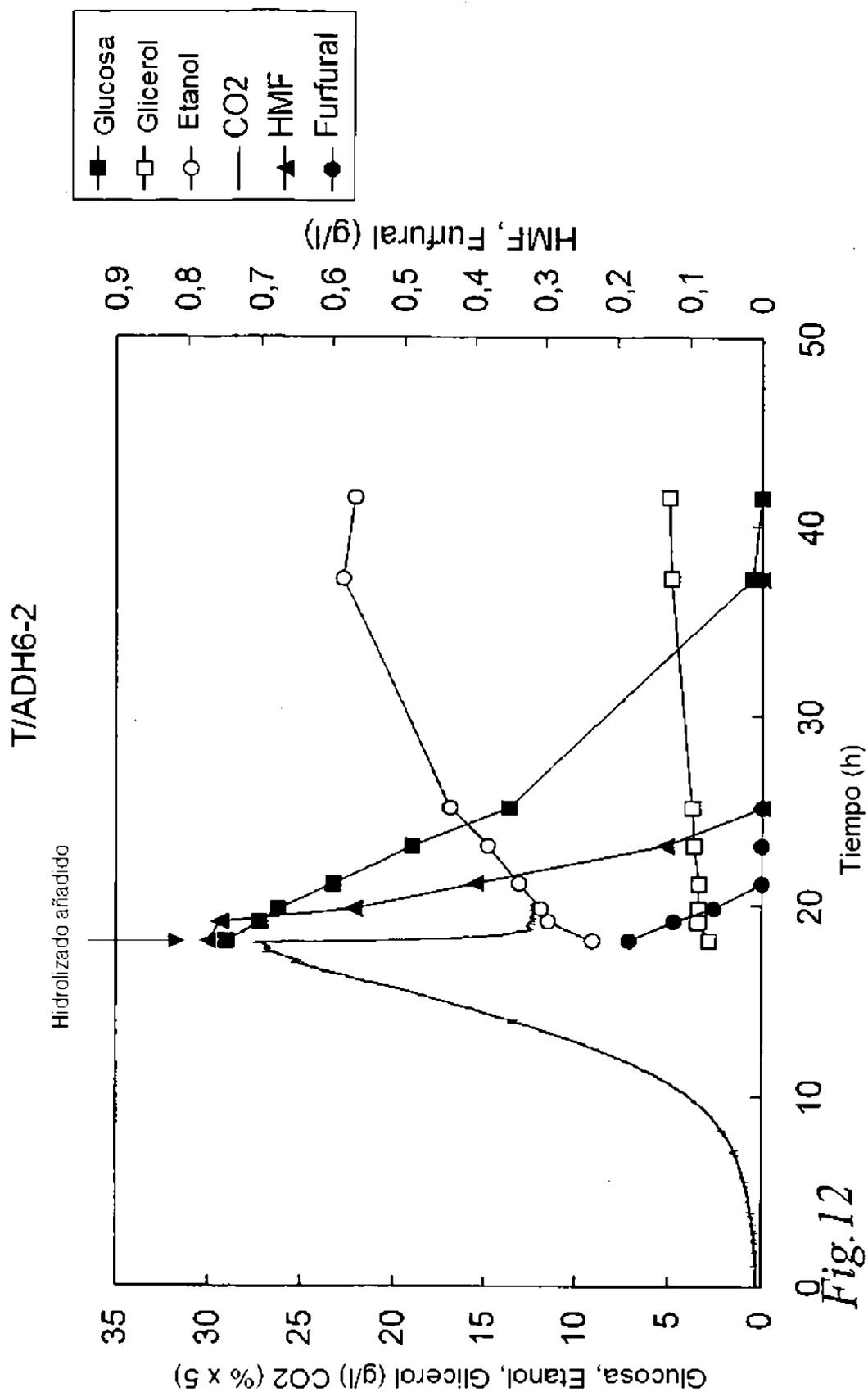


Fig. 12