

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 857**

51 Int. Cl.:
C12P 7/06 (2006.01) **C07K 14/195** (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/92 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08844803 .0**
96 Fecha de presentación: **30.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2209899**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2010**

54 Título: **Zymomonas con producción aumentada de etanol en medio que contiene azúcares concentrados y acetato**

30 Prioridad:
30.10.2007 US 983750 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2012

73 Titular/es:
**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DE 19898, US y
ALLIANCE FOR SUSTAINABLE ENERGY, LLC**

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/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 385 857 T3

DESCRIPCIÓN

Zymomonas con producción aumentada de etanol en medio que contiene azúcares concentrados y acetato

REMISIÓN A UNA SOLICITUD AFÍN

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional U.S. No. 60/983750 presentada el 30 de octubre de 2007.

DECLARACIÓN DE DERECHOS DEL GOBIERNO

Esta invención se realizó con ayuda del Gobierno de los Estados Unidos bajo 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 la Energía Sostenible, LLC, el Director y Operador del Laboratorio Nacional de Energías Renovables. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a los campos de la microbiología y la ingeniería genética. Más específicamente, se encontró que el gen *himA*, codificante de la subunidad alfa del factor de integración del hospedador (IHF), está implicado en la tolerancia de *Zymomonas* al acetato. Se desarrolló una cepa de *Zymomonas* que utiliza xilosa con una modificación genética del gen *himA*, que exhibe producción aumentada de etanol en presencia de acetato.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La producción de etanol por microorganismos proporciona una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles y es por consiguiente un área importante de investigación actual. *Zymomonas mobilis* es un etanológeno bacteriano que crece en glucosa, fructosa, y sacarosa, metabolizando estos azúcares a CO₂ y etanol por el camino de Entner-Doudoroff.

Es deseable utilizar biomasa lignocelulósica hidrolizada que puede proporcionar un sustrato de carbono disponible en cantidades abundantes y de coste bajo, para uso en 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 utilizar xilosa como fuente de carbono, se han producido por ingeniería genética cepas recombinantes que son capaces de crecer sobre este azúcar (US 5.514.583, US 5.712.133, WO 95/28476, Feldmann et al. (1982) Appl Microbiol Biotechnol 38:354-361, Zhang et al. (1995) Science 367:240-243). Estas cepas están modificadas para 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 (US 5.514.583, US 6.566.107; Zhang et al. (1985) 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 subsiguientemente en etanol y CO₂ en el lado de glucosa del camino (Figura 1).

Aunque se ha logrado éxito en la producción por ingeniería genética de cepas de *Z. mobilis* para el metabolismo de la xilosa, las cepas no crecen y producen etanol en xilosa tan bien como en glucosa. Incluso en circunstancias ideales, el metabolismo de la xilosa es tres o cuatro veces más lento que el metabolismo de la glucosa (Lawford et al. (2000) Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86:277-293), y la diferencia se hace mucho mayor en condiciones adversas. Debido al lento flujo del carbono, el nivel de ATP en estado estacionario es también menor con 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 los inhibidores cuando se cultiva sobre 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 en la utilización de biomasa lignocelulósica hidrolizada para fermentación es la presencia de acetato (Kim et al. (2000) Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86:357-370, que se libera de los residuos xilosa acetilados en hemicelulosa durante los procesos de pre-tratamiento y sacarificación.

Los mecanismos para que *Z. mobilis* haga frente al estrés relacionado con el acetato y otros ácidos orgánicos no están dilucidados, y no existe informe alguno en la bibliografía acerca de los genes que pueden jugar un papel en este proceso. Por consiguiente, la utilización de diseño racional para producir por ingeniería genética una cepa que tenga resistencia incrementada al acetato no es una opción en la actualidad. Por otra parte, se han descrito mutantes de *Z. mobilis* que tienen mayor tolerancia al acetato (Joachimsthal et al. (1998) Biotechnol. Lett. 20(2):137-142; Jeon et al. (2002) Biotechnol. Lett. 24:819-824; Solicitud de Patente US 20030162271). Se utilizó la selección después de mutagénesis química aleatoria con nitrosoguanidina (NTG) para generar estos mutantes, pero los genes modificados que eran responsables del fenotipo resistente al acetato no fueron identificados en ninguno de estos casos. Tampoco se determinó si eran necesarias una sola mutación o múltiples mutaciones para mejor eficiencia de fermentación en presencia de acetato. Por consiguiente, no se conoce actualmente por los estudios arriba citados el modo de impartir tolerancia al acetato a otras cepas de *Z. mobilis* utilizando ingeniería genética dirigida.

Persiste la necesidad de identificar genes implicados en la tolerancia al acetato que puedan modificarse para producir cepas de *Zymomonas* tolerantes al acetato para fermentación de hidrolizado, producido a partir de biomasa lignocelulósica pretratada y sacarificada, a fin de producir etanol.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa que tienen una eficiencia mejorada 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 hospedador (IHF). Una *Zymomonas* que utiliza xilosa con una modificación genética adicional del gen *himA* tiene tolerancia incrementada al acetato cuando se cultiva en
10 en mixturas 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 *himA* modificada que para una cepa comparable que exprese el gen *himA* normal.

De acuerdo con ello, la invención proporciona un microorganismo recombinante del género *Zymomonas* que es capaz de utilizar xilosa para producir etanol por fermentación en un medio de azúcares mixtos, comprendiendo dicho
15 microorganismo al menos una modificación genética que reduce la expresión del gen *himA* endógeno que codifica la proteína de la subunidad alfa del factor de integración del hospedador. Adicionalmente, la presente invención proporciona un proceso para generar el microorganismo arriba descrito, comprendiendo dicho proceso:

a) proporcionar una cepa de *Zymomonas* recombinante capaz de utilizar xilosa para producir etanol en condiciones adecuadas en las que el genoma de dicha cepa expresa la proteína de la subunidad alfa del
20 hospedador de integración endógeno (HimA); y

b) modificar el genoma de dicha cepa en donde dicha modificación reduce la expresión de la proteína de la subunidad alfa del factor endógeno de integración del hospedador (HimA).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS Y DESCRIPCIONES DE LAS SECUENCIAS

25 La invención puede comprenderse más plenamente a partir de la descripción detallada que sigue, las Figuras, y las descripciones de secuencias que se acompañan que forman parte de esta solicitud.

La Figura 1 muestra un diagrama de las cuatro enzimas (en recuadros) que se han utilizado para producir por ingeniería genética *Z. mobilis* para utilización de xilosa y los caminos bioquímicos para producción de etanol utilizando xilosa.

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

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

35 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 de control, ZW801-4, en medio con 100 g/l glucosa, 90 g/l xilosa y 6 g/l acetato (A), o con 105 g/l glucosa, 100 g/l xilosa y 9 g/l acetato (B).

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

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

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 glucosa, 100 g/l xilosa, y 9 g/l acetato.

45 La Figura muestra gráficos de utilización de glucosa, utilización de xilosa, y producción de etanol para ZW801-4 (A) y AcR#3 (B) en medio hidrolizado simulado 100%, que contiene ~9,5 g/l acetato e iones amonio 190 mM, con 110 g/l glucosa y 90 g/l xilosa.

La Figura 9 muestra mapas de los plásmidos producidos durante la construcción de un vector silenciador del gen *himA* pLDHTc139#7 (A), pLDHTc139#7-9WW (B), y pLDHSp-9WW (C).

50 La Figura 10A muestra la localización genómica de los cebadores utilizados para preparar DNA flanqueante de *himA* para inserción en el vector suicida de *himA*, pHimA, y un mapa circular del plásmido pHimA se muestra en la Figura 10B.

La Figura 11 muestra gráficos de utilización de glucosa, utilización de xilosa, y producción de etanol para ZW801-4 (A) y ZW801-4::ΔhimA (B) en medio Hidrolizado Simulado 100%, que contiene ~9,5 g/l acetato e iones amonio 190 mM, con 110 g/l glucosa y 90 g/l xilosa.

5 La Figura 12 muestra gráficos de crecimiento en medios que contienen glucosa para ZW801-4 (A), AcR#3 (B), y ZW801-4::ΔhimA (C) con 0 u 8 g/l acetato añadido como la sal de potasio.

La invención puede comprenderse más plenamente a partir de la descripción detallada siguiente y las descripciones de secuencias que se acompañan que forman parte de esta solicitud.

10 Las secuencias siguientes están de acuerdo 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 World Intellectual Property Organization (WIPO) Standard ST.25 (1998) y los requerimientos de listado de secuencias de la EPO y la PCT (Reglas 5.2 y 49.5(a-bis), y la Sección 208 y el Anexo C de las Instrucciones Administrativas). Los símbolos y el formato utilizados para los datos de secuencia de nucleótidos y aminoácidos cumplen las reglas expuestas en 37 C.F.R. §1.822.

15 Se proporciona un Listado de Secuencias adjunto a esta memoria en Disco Compacto. Los contenidos del Disco Compacto que contienen el Listado de Secuencias cumplen con 37 CFR 1.52(e). Los Discos Compactos se presentan por duplicado y son idénticos uno a otro. Los discos están marcados "Copia 1 - Listado de Secuencias" y "Copia 2 - Listado de Secuencias". Los discos contienen el archivo siguiente: CL4039 seq. list. ST25.

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de la región codificante de *himA* de *Zymomonas mobilis*.

20 SEQ ID NOS: 2 y 3 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores de secuenciación de sitios de inserción de transposón.

SEQ ID NOS: 4 y 5 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para amplificación PCR de un fragmento del DNA que contiene el gen *ldh* y algo del DNA circundante.

SEQ ID NOS: 6 y 7 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para amplificación PCR de un fragmento de DNA que contiene la casete de resistencia a tetraciclina de pACY184.

25 SEQ ID NOS: 8 y 9 son las secuencias de nucleótidos de los oligos utilizados para preparar un sitio loxP para inserción en el plásmido pLDHTc139#7.

SEQ ID NOS: 10 y 11 son las secuencias de nucleótidos de los oligos utilizados para preparar un sitio loxP para inserción en el plásmido pLDHTc139#7-9W.

30 SEQ ID NOS: 12 y 13 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para amplificación PCR de un fragmento de DNA que contiene la casete de resistencia a espectinomicina del plásmido pHP15578.

SEQ ID NOS: 14 y 15 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para amplificación PCR de un fragmento de DNA flanqueante de *himA* 3'.

SEQ ID NOS: 16 y 17 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación PCR de un fragmento de DNA flanqueante de *himA* 5'.

35 SEQ ID NOS: 18 y 19 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores PCR que se utilizaron para confirmar que había ocurrido un evento de entrecruzamiento simple entre el DNA flanqueante de *himA* 5' en pHimA y su homólogo cromosómico.

40 SEQ ID NOS: 20 y 21 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores PCR que se utilizaron para confirmar que había ocurrido un evento de entrecruzamiento simple entre el DNA flanqueante de *himA* 3' en pHimA y su homólogo cromosómico.

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención describe cepas de *Zymomonas* recombinantes que utilizan xilosa, que se han elaborado ulteriormente por ingeniería genética por modificación del gen *himA* endógeno, y un proceso para generar cepas de *Zymomonas* con *himA* modificado. La modificación reduce la expresión del gen *himA*, y da como resultado una eficiencia mejorada de la cepa modificada en *himA* cuando se cultiva en un medio que contiene azúcares mixtos que incluyen xilosa y acetato. Estas cepas pueden utilizarse en un proceso para producción de etanol en el cual se cultiva una cepa modificada en un medio que incluye xilosa. El etanol producido por la nueva cepa de *Zymomonas* puede utilizarse como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles.

Se utilizarán las abreviaturas y definiciones siguientes para la interpretación de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

El "factor de integración del hospedador" se abrevia IHF.

"Gen" hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, que puede incluir secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes 5') y siguen (secuencias no codificantes 3') a la secuencia codificante. "Gen nativo" o "gen de tipo salvaje" hace referencia a un gen tal como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" hace referencia a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. De acuerdo con ello, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de fuentes diferentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de la misma fuente, pero dispuestas de una manera distinta a la que se encuentra en la naturaleza. "Gen endógeno" hace referencia a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" hace referencia a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo hospedador, pero que se introduce en el organismo hospedador por transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos.

El término "constructo genético" hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que codifica la expresión de una o más proteínas específicas. En el constructo génico el gen puede ser nativo, quimérico, o de naturaleza extraña. Típicamente, un constructo genético comprenderá una "secuencia codificante". Una "secuencia codificante" hace referencia a una secuencia de DNA que codifica una secuencia de aminoácidos específica.

Los términos "promotor" o "regiones de control de la iniciación" hacen referencian a una secuencia de DNA capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o RNA funcional. En general, una secuencia codificante está localizada 3' con respecto a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar compuestos de elementos diferentes derivados de distintos promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos sintéticos de DNA. Se comprenderá por los expertos en la técnica que promotores diferentes pueden dirigir la expresión de un gen en tejidos o tipos de células diferentes, o en etapas diferentes del desarrollo, o en respuesta a condiciones ambientales diferentes. A los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células en la mayor parte de las ocasiones se hace referencia comúnmente como "promotores constitutivos".

El término "expresión", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la transcripción y acumulación estable de RNA sentido (mRNA) o antisentido derivado de un gen. La expresión puede referirse también a la traducción de mRNA en un polipéptido. "Inhibición antisentido" hace referencia a la producción de transcritos de RNA antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. "Sobreexpresión" hace referencia a la producción de un producto génico en organismos transgénicos que excede de los niveles de producción en organismos normales o no transformados. "Co-supresión" hace referencia a la producción de transcritos de RNA sentido capaces de suprimir la expresión de genes extraños o endógenos idénticos o sustancialmente similares (U.S. 5.231.020).

El término "RNA mensajero (mRNA)", como se utiliza en esta memoria, hace referencia al RNA que carece de intrones y que puede ser traducido en proteína por la célula.

El término "gen no funcional", como se utiliza en esta memoria, hace referencia 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 interrumpirse a cualquier nivel, tal como la transcripción, el procesamiento del RNA, o la traducción. Un gen no funcional exhibe típicamente poca o ninguna expresión de la proteína codificada. No obstante, el mismo puede codificar también una proteína modificada que tiene menor actividad enzimática que la proteína de tipo salvaje.

El término "transformación" como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico a un organismo diana, que da como resultado una herencia genéticamente estable. El ácido nucleico transferido puede encontrarse en la forma de un plásmido mantenido en la célula hospedadora, o cualquier ácido nucleico transferido puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora. A los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se hace referencia como organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

- Los términos “plásmido” y “vector” como se utilizan en esta memoria, hacen referencia a un elemento extracromosómico que transporta a menudo genes que no forman parte del metabolismo central de la célula, y usualmente en la forma de moléculas circulares de DNA bicatenario. Tales elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias integrantes del genoma, secuencias de fago o secuencias de nucleótidos, lineales o circulares, de un DNA o RNA mono- o bi-catenario, derivadas de cualquier fuente, en las cuales cierto número de secuencias nucleotídicas se han unido o recombinado en una sola construcción que es capaz de introducir un fragmento promotor y secuencia de DNA para un producto génico seleccionado junto con una secuencia 3' no traducida apropiada en una célula.
- El término “enlazado operativamente” hace referencia a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un fragmento simple de ácido nucleico de tal modo que la función de una se ve afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de dicha secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante se encuentra bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar enlazadas operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.
- El término “marcador seleccionable” significa un factor de identificación, usualmente un gen de resistencia a antibióticos o productos químicos, que es susceptible de ser seleccionado basándose en el efecto marcador del gen, es decir, la resistencia a un antibiótico, en donde el efecto se utiliza para rastrear la herencia de un ácido nucleico de interés y/o para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés.
- El término “concentración elevada de azúcares mixtos” hace referencia a una concentración total de azúcares en el medio que da como resultado la inhibición del crecimiento de *Z. mobilis* utilizador de xilosa. Esto ocurre típicamente cuando la concentración total de azúcares excede de aproximadamente 100 g/l, y la severidad del efecto es mayor a concentraciones de azúcares más altas. Sin embargo, la concentración exacta de azúcares a la que comienza a producirse la inhibición del crecimiento depende acusadamente de otros componentes del medio.
- El término “azúcar fermentable” hace referencia a oligosacáridos y monosacáridos que pueden ser utilizados como fuente de carbono por un microorganismo en un proceso de fermentación.
- El término “lignocelulósico” hace referencia a una composición que comprende a la vez lignina y celulosa. El material lignocelulósico puede comprender también hemicelulosa.
- El término “celulósico” hace referencia a una composición que comprende celulosa y componentes adicionales, con inclusión de hemicelulosa.
- El término “sacarificación” hace referencia 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.
- “Biomasa” hace referencia a cualquier material celulósico o lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa, y comprende además opcionalmente hemicelulosa, lignina, almidón, polisacáridos, oligosacáridos y/o monosacáridos.
- La biomasa puede comprender también componentes adicionales, tales como proteína y/o lípido. La biomasa puede derivarse de una sola fuente, o la biomasa puede comprender una mixtura derivada de más de una fuente; por ejemplo, la biomasa podría comprender una mixtura de carozos de maíz y forraje o fibras de maíz, o una mixtura de hierbas y hojas. La biomasa incluye, pero sin carácter limitante, cosechas bioenergéticas, residuos agrícolas, residuos sólidos urbanos, residuos sólidos industriales, lodos de la fabricación de papel, residuos de jardines, madera y residuos forestales. Ejemplos de biomasa incluyen, pero sin carácter limitante, granos de maíz, carozos de maíz, residuos de cosechas tales como vainas de maíz, maíz forrajero, fibra de maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, panizo, papel residual, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, arbustos y matorrales, hortalizas, frutos, flores y estiércol animal.
- “Hidrolizado de biomasa” hace referencia al producto resultante de la sacarificación de la biomasa. La biomasa puede también pretratarse antes de la sacarificación.
- Las técnicas estándar de DNA recombinante y de clonación molecular utilizadas en esta memoria son bien conocidas en la técnicas y han sido descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 (en lo sucesivo “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.

La presente invención se refiere a cepas de *Zymomonas* producidas por ingeniería genética que utilizan xilosa que tienen una eficiencia mejorada 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 sub-producto metabólico de *Z. mobilis* y es también un componente de la biomasa pretratada y sacarificada. Por consiguiente, un reto en la utilización de azúcares derivados de biomasa para la fermentación estriba en vencer los efectos inhibidores del acetato sobre el biocatalizador para la producción incrementada de etanol. Los solicitantes han descubierto que la producción por ingeniería genética de una interrupción del gen *himA* endógeno en *Z. mobilis* que utiliza xilosa mejora la eficiencia de fermentación, con inclusión de la utilización de xilosa y la producción de etanol, cuando el medio de fermentación contiene acetato. Adicionalmente, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de etanol en el que las cepas de *Zymomonas* presentes se cultivan en un medio que contiene xilosa.

Cepa hospedadora de *Zymomonas* que utiliza xilosa

Cualquier cepa de *Zymomonas* que sea capaz de utilizar xilosa como fuente de carbono puede utilizarse como hospedador para la preparación de las cepas de la presente invención. Las cepas de *Z. mobilis* que han sido modificadas por ingeniería genética para fermentación de xilosa a etanol son particularmente útiles. Los genes endógenos pueden proporcionar parte del camino metabólico, o pueden alterarse por cualquier técnica conocida de manipulación genética 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 en la creación de un camino de utilización de xilosa. Típicamente se han introducido cuatro genes en *Z. mobilis* para expresión de cuatro enzimas implicadas en el metabolismo de la xilosa (Figura 1) como se describe en US 5.514.583. Éstos incluyen genes que codifican xilosa-isomerasa, que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa y xiluloquinasa, que fosforila la xilulosa para formar xilulosa 5-fosfato. Adicionalmente, la transcetolasa y la transaldolasa, dos enzimas del camino de los pentosa-fosfatos, convierten xilulosa 5-fosfato en compuestos intermedios (fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato) que acoplan el metabolismo de las pentosas al camino glicolítico de Entner-Doudoroff, permitiendo el metabolismo de la xilosa a etanol. Secuencias de DNA que codifican estas enzimas pueden obtenerse a partir de cualquiera de numerosos microorganismos que son capaces de metabolizar la xilosa, tales como bacterias entéricas, y algunas levaduras y hongos. Fuentes para las regiones codificantes incluyen *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhodobacter*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, y *Zymomonas*. Son particularmente útiles las regiones codificantes de *E. coli*.

Las secuencias de DNA codificante están enlazadas operativamente a promotores que se expresan en células de *Z. mobilis* tales como el promotor de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Z. mobilis* (promotor GAP), y enolasa de *Z. mobilis* (promotor ENO). Las regiones codificantes pueden expresarse individualmente a partir de promotores, o pueden unirse dos o más regiones codificantes en un operón con expresión por el mismo promotor. Los genes quiméricos resultantes pueden introducirse en *Zymomonas* y mantenerse en un plásmido, o integrarse en el genoma utilizando, por ejemplo, recombinación homóloga, integración orientada, o integración aleatoria. Cepas utilizadoras de xilosa que son de uso particular incluyen CP4 (pZB5) (US 5514583), ATCC31821/pZB5 (US 6566107), 8b (US 20030162271; Mohagheghi et al., (2004) Biotechnol. Lett. 25; 321-325), y ZW658 (ATTCC #PTA-7858).

Cepas de *Z. mobilis* que se han modificado adicionalmente por ingeniería genética para utilizar azúcares distintos de xilosa, que no son utilizados normalmente por las mismas, pueden utilizarse también en el presente proceso. Un ejemplo es una cepa de *Z. mobilis* utilizadora de xilosa que fue modificada ulteriormente por ingeniería genética para utilización de arabinosa como se describe en US 5.843.760.

También pueden utilizarse cepas de *Z. mobilis* que se han modificado adicionalmente por ingeniería genética para producción reducida del subproducto no deseado xilitol. Estas cepas se describen en la solicitud de patente U.S. del mismo propietario y también en tramitación, #11/862566 y la publicación de patente U.S. en tramitación #US20080187973 A1. Las cepas ZW800, ZW801-4 y ZW801-6 descritas tienen un gen interrumpido que codifica glucosa-fructosa oxidoreductasa (GFOR). La interrupción de la expresión del gen GFOR puede realizarse utilizando los mismos métodos descritos más adelante para interrupción del gen *himA*, utilizando la secuencia conocida de la región codificante de GFOR (SEQ ID NO: 24). Las secuencias de DNA que rodean la secuencia codificante de GFOR son también útiles en algunos procedimientos de modificación y están disponibles para *Z. mobilis* en la secuencia genómica completa (acceso a GenBank #AE008692). Se encontró que la expresión reducida de GFOR reduce la producción de xilitol y aumenta la producción de etanol.

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

Aunque la base mecánica para los efectos inhibidores del acetato sobre el crecimiento y la productividad de *Z. mobilis* está razonablemente bien comprendida (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 han sido identificados para este microorganismo. Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que la manipulación genética del gen *himA* permite que *Zymomonas* se comporte mejor en presencia de concentraciones inhibitorias 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 una biblioteca de mutantes que se utilizó para descubrir el papel de *himA* en la resistencia al acetato descrita en esta memoria en los Ejemplos 1 y 2 es un enfoque carente totalmente de sesgo, y no estaba basado en ningún resultado predicho.

El descubrimiento de que la interrupción del gen *himA* de *Z. mobilis* mejora la eficiencia en presencia de acetato es inesperado, dado que no existe indicación o sugerencia alguna en la bibliografía de que este gen juegue un papel en la tolerancia al acetato para *Zymomonas* o cualquier otro microorganismo. La proteína, a la que se refiere también en esta memoria como la proteína HimA, codificada por el gen *himA* es la subunidad alfa (SEQ ID NO: 26) del factor de integración del hospedador (IHF), una proteína que incluye también una subunidad beta codificada por el gen *himD*. Así, IHF es una proteína heterodímera que está constituida por dos subunidades estrechamente relacionadas. IHF ha sido estudiada en *E. coli* y se ha demostrado que es una proteína de fijación de DNA y plegamiento de DNA que está implicada en la recombinación del DNA, la replicación del DNA, y la regulación de la expresión génica (Friedman (1988) Cell 55:545-554; Arfin et al. (2000) J. Biol. Chem, 275: 29672-29684). Experimentos de determinación del perfil de expresión génica en *E. coli* han demostrado que la desactivación del gen *himA* altera significativamente el nivel de expresión de al menos 120 genes, y que esta manipulación activa más genes que reprime (Arfin et al. (2000) J. Biol. Chem. 1975:29672-29684) se sabe también que el gen *himA* de *E. coli* se transcribe más activamente cuando las células sufren transición desde la fase exponencial a la fase estacionaria, y se cree que el producto del gen *himA* juega un papel en este proceso. Así, *himA* afecta a una extensa gama de procesos del DNA y es un regulador de la expresión génica en *E. coli*, pero ninguno de los muchos genes que se cree son regulados por el mismo están relacionados claramente con la tolerancia al acetato. Adicionalmente, el análisis global de la expresión génica en *E. coli* después de exposición a una concentración inhibitoria de acetato ha sido examinado utilizando microrredes, y entre los 86 genes que se veían afectados por este tratamiento no se encontraba el gen *himA* (Arnold et al. (2001) J. Bacteriol. 183: 2178-2186). Finalmente, no se conoce nada acerca del papel del gen *himA* en *Zymomonas*. Los autores de la presente invención no son conocedores tampoco de ningún informe en la bibliografía que demuestre que la desactivación del gen *himA* dé como resultado tipo alguno de efecto beneficioso. De hecho, es sorprendente que pudiera ocurrir esto, considerando el gran número de genes y proteínas que se ven afectados probablemente por esta manipulación. Por consiguiente, es razonable llegar a la conclusión de que los expertos en la técnica no podrían haber predicho que la desactivación del gen *himA* pudiera conferir mayor tolerancia al acetato para *Z. mobilis* o cualquier otro microorganismo.

La proteína HimA de *Z. mobilis* tiene una identidad de 46% con su homólogo de *E. coli* (número de acceso a GenBank NP_416227). La proteína conocida más estrechamente afín es el homólogo *himA* de *Sphingomonas wittichii* (número de acceso a GenBank YP_001264041) con el que tiene una identidad de 67%, como se determina por una búsqueda tBLASTx contra la base de datos NCBI utilizando la región codificante *himA* de *Z. mobilis* (SEQ ID NO: 1), como la secuencia de búsqueda.

Alteración de la expresión del gen *himA*

Una cepa de *Z. mobilis* de la presente invención que utiliza xilosa se modifica genéticamente de tal manera que exista una expresión reducida o nula de la proteína de la subunidad alfa del factor de integración del hospedador (HimA). Típicamente, la reducción en la expresión de la proteína HimA se realiza por 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 mRNA codificante, o reducen la estabilidad de la proteína HimA. La expresión reducida de la proteína HimA da como resultado un comportamiento mejorado en presencia de acetato. Cualquier método de modificación genética conocido por un experto en la técnica para reducir la expresión de una proteína puede utilizarse para alterar la expresión de *himA*. Métodos incluyen, pero sin carácter limitante, la delección de la totalidad o una porción del gen *himA*, la inserción de un fragmento de DNA en el gen *himA* (en el promotor o la región codificante) de tal modo que la proteína codificada no pueda expresarse, la introducción de una mutación en la región codificante de *himA* que añade un codón de parada o desplazamiento de marco de tal modo que no se exprese una proteína funcional, y la introducción de una o más mutaciones en la región codificante de *himA* para alterar los aminoácidos de tal modo que se exprese una proteína no funcional o menos activa funcionalmente. Adicionalmente, la expresión de *himA* puede bloquearse por expresión de un RNA antisentido o un RNA de interferencia, y pueden introducirse constructos que dan como resultado cosupresión. Todos estos métodos pueden llevarse a la práctica fácilmente por un experto en la técnica haciendo uso de la secuencia codificante conocida de *himA* (SEQ ID NO: 1), así como la secuencia de DNA de *Z. mobilis* que rodea la secuencia codificante de *himA*, que está disponible en la secuencia completa del genoma de *Z. mobilis* (Acceso a GenBank #AE008692).

Un método particularmente adecuado para crear una cepa genéticamente modificada de *himA* como se ilustra en esta memoria en los Ejemplos 5 y 6, es la utilización de recombinación homóloga mediada por secuencias de DNA flanqueantes de *himA* que limitan un gen de resistencia a espectinomicina u otro gen marcador, conduciendo a inserción del gen marcador en la región codificante de *himA* de tal modo que no se exprese una proteína funcional. Adicionalmente, el gen marcador puede estar limitado por sitios de recombinación de acción específica, de tal modo que subsiguientemente a la expresión de la recombinasa de acción específica correspondiente, el gen de resistencia se escinde del gen *himA*. La recombinación de acción específica deja atrás un sitio de recombinación que interrumpe la expresión del gen *himA*. El vector de recombinación homóloga puede construirse de tal modo que deje también una delección en el gen *himA* después de la escisión del marcador, como es bien conocido por los expertos en la técnica.

Se prefiere eliminar por completo la expresión de *himA*; sin embargo, una expresión notablemente reducida de *himA* es también una realización de la presente invención. En este caso, un gen *himA* no funcional se refiere a la interrupción del funcionamiento de la manera normal de tal modo que estén presentes niveles de proteína codificada inferiores a los normales. Algunos métodos de desactivación génica pueden dar como resultado cierta expresión remanente de bajo nivel, tal como la co-supresión. En esta memoria, el término cepa *himA* modificada se refiere a una cepa modificada genéticamente con actividad enzimática reducida o nula de *himA*.

Comportamiento de la cepa *himA* modificada

Una cepa de *Z. mobilis* modificada en *himA* que utiliza xilosa de la presente invención tiene eficiencia mejorada cuando se cultiva en un medio que contiene xilosa, y que contiene también acetato. Es deseable utilizar azúcares que se produzcan por sacarificación de biomasa en un medio de cultivo para *Z. mobilis* que utilice xilosa. Típicamente, la biomasa se somete a pretratamiento, por ejemplo como se describe en la Publicación de Patente WO 2004/081185 y en la publicación US 20070031918A1 del mismo propietario también en tramitación, y se trata luego con enzimas de sacarificación como ha sido revisado en Lynd, L.R., *et al.*, (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66:506-577). El producto hidrolizado del pretratamiento y la sacarificación de la biomasa que contiene xilosa y otros azúcares contiene también típicamente acetato. La hemicelulosa de la biomasa contiene residuos xilosa acetilados, y el acetato se libera en condiciones muy suaves. Aunque la eliminación del acetato de la biomasa procesada es una vía para resolver el problema, la incorporación de este paso podría aumentar sustancialmente el coste de la fabricación de etanol celulósico. Por consiguiente, la posibilidad de modificar genéticamente cepas de *Z. mobilis* a fin de proporcionar mayor tolerancia al acetato es una mejora sustancial.

La eficiencia mejorada en presencia de acetato como se ensaya en esta memoria incluye crecimiento, utilización de xilosa y producción de etanol. La eficiencia mejorada de una cepa de *Z. mobilis* modificada en *himA* que utiliza xilosa hace relación a una cepa con las mismas características genéticas (una cepa isogénica), pero que carece de una modificación del gen *himA*. En esta comparación se utiliza típicamente la cepa parental utilizada para modificación genética del gen *himA*. La mejora puede observarse para cualquier nivel de acetato en el cual una cepa *himA* sin modificar no alcanza su potencial pleno para 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. La extensión de la "inhibición de acetato" depende también del pH, dado que la especie inhibidora es realmente ácido acético, y el equilibrio de ácido acético y acetato depende del pH. Sin control del pH, *Z. mobilis* acidifica rápidamente el medio de cultivo, al igual que otras bacterias gram-negativas. Con una disminución del pH de 5,8 a 4,8, la concentración de ácido acético aumenta 5 veces debido al $pK_A \sim 4,8$ del ácido acético. Así pues, la concentración real de ácido acético (el inhibidor) depende del pH del medio de cultivo así como de la cantidad total de las especies protonizada y no protonizada que está presente en el medio de cultivo.

En una mezcla concentrada de glucosa y xilosa con acetato presente, las cepas *himA* sin modificar y modificada utilizan glucosa análogamente en condiciones de pH controladas, consumiéndose en gran parte la glucosa antes del consumo de la xilosa. Sin embargo, durante la última etapa de la fermentación, después que se ha agotado la totalidad de la glucosa, la cepa modificada de *himA* es capaz de convertir más xilosa en etanol que la cepa parental isogénica que tiene una expresión normal del gen *himA*.

El nivel de producción incrementada de etanol conferido por la modificación del gen *himA* depende de los componentes del medio de cultivo en condiciones controladas de pH, con inclusión de los niveles y ratios de tipos de azúcares y la presencia de otros inhibidores. Por ejemplo, en presencia de 126 g/l glucosa, 107 g/l xilosa y 10% de acetato se registraba un aumento de 4% en el título de etanol para la cepa modificada de *himA* en comparación con la cepa isogénica sin modificación en *himA*. Cuando el medio de cultivo contiene además otros inhibidores, la producción incrementada de etanol puede ser mayor aún. Por ejemplo, en un medio hidrolizado simulado que incluye 110 g/l glucosa, 90 g/l xilosa, ~9,5 g/l acetato e iones amonio 190 mM (otro inhibidor del crecimiento de *Z. mobilis* (Agrawal (1989) *Biotechnology & Bioengineering* 34:278-281) que puede estar presente en el hidrolizado de biomasa a esta concentración) se registró aproximadamente un aumento de 11% en la producción de etanol y una utilización más completa de la xilosa. Así pues, en condiciones más severas, el diferencial en la producción de etanol entre una cepa modificada de *himA* y una cepa isogénica no modificada de *himA* podría ser mayor aún que en los ejemplos citados. Por ejemplo, a concentraciones mayores de azúcar o cuando están presentes también otros inhibidores derivados de hidrolizado además de iones amonio y acetato. Por consiguiente, dependiendo de las condiciones de cultivo, el aumento en la producción de etanol puede ser al menos aproximadamente 4% o mayor.

Fermentación para Producción de Etanol

El proceso de la presente invención, la presente cepa modificada en *himA* que utiliza xilosa se cultiva en un medio que contiene cualquier mezcla de jabones que incluye también xilosa. En particular, la presente cepa puede cultivarse en hidrolizado de biomasa, o en una dilución de hidrolizado de biomasa. La sacarificación de la biomasa produce azúcares en un hidrolizado de biomasa que pueden incluir típicamente una mezcla de xilosa con glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, manosa y/o arabinosa. Se prefiere una composición de azúcares mixtos que incluye xilosa y glucosa, en la cual pueden estar presentes azúcares adicionales. La ratio de los diferentes azúcares puede variar en la mezcla, representando típicamente la xilosa al menos aproximadamente 10% de la cantidad total de azúcares. Preferiblemente, la xilosa comprende entre aproximadamente 40% y aproximadamente 60%. La fructosa

está presente en los azúcares producidos por sacarificación de algunas biomasa tales como el bagazo de la caña de azúcar, y puede reemplazar una porción de la xilosa o la glucosa, de tal modo que la xilosa se mantenga en al menos aproximadamente 10% de la mixtura de azúcares. Adicionalmente, la arabinosa se deriva de la hemicelulosa y es por consiguiente un componente típico de los azúcares mixtos derivados de una biomasa sacarificada que contenga hemicelulosa. Durante la fermentación con las presentes cepas, la xilosa es uno de los azúcares que se utiliza como fuente de carbono para producción de etanol. Para producción de etanol y eficiencia máximas de la fermentación es deseable cultivar la presente cepa utilizadora de xilosa modificada en *himA*, en un medio que contenga una mixtura concentrada de azúcares, con inclusión de xilosa. Esto permite el uso directo de los azúcares de sacarificación de la biomasa, o el uso con poca dilución, reduciendo con ello los volúmenes de fermentación, lo cual es deseable para una producción de etanol a escala comercial. Se utilizan concentraciones elevadas de azúcares a fin de que puedan producirse mayores concentraciones de etanol. La concentración de azúcares mixtos en el medio de fermentación es por regla general al menos aproximadamente 120 g/l y hasta aproximadamente 300 g/l. Es particularmente útil una concentración elevada de azúcares mixtos que esté comprendida entre aproximadamente 150 g/l y aproximadamente 235 g/l.

En las condiciones de alta concentración de azúcares mixtos deseadas para la producción de etanol, puede estar incluido sorbitol en el medio de fermentación utilizado para cultivar la *Z. mobilis* modificada en *himA* que utiliza xilosa como se describe en la publicación US del mismo propietario también en tramitación #US20080081358A1. El sorbitol (D-sorbitol y/o L-sorbitol) puede estar presente en el medio a concentraciones que están comprendidas entre aproximadamente 2 mM y 200 mM. Concentraciones finales más adecuadas en el medio son concentraciones comprendidas entre aproximadamente 2 mM y 100 mM, prefiriéndose concentraciones entre 5 mM y 20 mM. Puede utilizarse en el medio manitol en lugar de sorbitol, o en combinación con sorbitol. Adicionalmente, se ha encontrado que pueden utilizarse galactitol y/o ribitol en lugar de o en combinación con sorbitol o manitol. Sorbitol, manitol, galactitol, ribitol o combinaciones de los mismos se utilizan todos ellos en las mismas concentraciones que se han descrito para sorbitol.

Z. mobilis se cultiva en el medio en el que tiene lugar la fermentación y se produce el etanol. La fermentación se realiza sin aporte de aire suplementario, oxígeno u otros gases (que pueden incluir condiciones tales como fermentación anaerobia, microaerobia, o microaerófila), durante al menos aproximadamente 24 horas, y puede realizarse durante 48 horas o más. El tiempo transcurrido hasta alcanzar la producción máxima de etanol es variable, dependiendo de las condiciones de fermentación. Típicamente, si están presentes inhibidores en el medio, se requiere un periodo de fermentación más largo. Las fermentaciones pueden realizarse a temperaturas que están comprendidas entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C, y a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5. Son particularmente adecuadas temperaturas entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C. Es también particularmente adecuado mantener el pH al menos aproximadamente a 1 unidad de pH por encima del pK_A del ácido acético, lo que llevaría el pH a un valor entre aproximadamente 5,8 y 7,5, a fin de reducir la ratio de ácido acético a acetato.

La *Z. mobilis* modificada en *himA* que utiliza xilosa puede cultivarse en un medio que contiene azúcares mixtos que incluyen xilosa en fermentadores de escala laboratorio, y en fermentación a mayor escala en la cual se producen cantidades comerciales de etanol. Adicionalmente, el medio puede contener acetato como se ha descrito arriba. En los casos en que se desee producción comercial de etanol, pueden aplicarse una diversidad de metodologías de cultivo. Por ejemplo, la producción en gran escala a partir de *Z. mobilis* modificada en *himA* utilizadora de xilosa puede realizarse por metodologías de cultivo tanto por lotes como continuas. Un método de cultivo clásico por lotes es un sistema cerrado en el que la composición del medio se fija al comienzo del cultivo y no se somete a alteraciones artificiales durante el proceso de cultivo. Así, al comienzo del proceso de cultivo se inocula el medio con el organismo deseado y se deja que tengan lugar el crecimiento o la actividad metabólica sin añadir nada al sistema. Típicamente, sin embargo, un cultivo "de lotes" es un lote con respecto a la adición de la fuente de carbono y se realizan a menudo intentos para controlar factores tales como pH y concentración de oxígeno. En los sistemas de lotes, las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que se termina el cultivo. Dentro de los cultivos por lotes, las células pasan típicamente por una fase estática de demora hasta una fase de crecimiento y finalmente a una fase estacionaria en la que se disminuye o cesa la tasa de crecimiento. Si se dejan sin tratar, las células en la fase estacionaria morirán finalmente. Las células en fase logarítmica son a menudo responsables de la mayor parte de la producción de producto final o intermedio en algunos sistemas. La producción en fase estacionaria o post-exponencial puede obtenerse en otros sistemas.

Una variación en el sistema estándar de lotes es el sistema de Alimentación por Lotes ("Fed-Batch"). Los procesos de cultivo Fed-Batch son adecuados también para cultivo de *Z. mobilis* modificada en *himA* que utiliza xilosa, y comprenden un sistema típico de lotes con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa el cultivo. Los sistemas Fed-Batch son útiles cuando la represión de los catabolitos es susceptible de inhibir el metabolismo de las células y donde es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medida de la concentración real de sustrato en los sistemas Fed-Batch es difícil y se estima por tanto sobre la base de los cambios de factores medibles tales como el pH y la presión parcial de los gases residuales tales como CO_2 . Los métodos de cultivo por lotes y Fed-Batch son comunes y bien 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).

- La producción comercial de etanol puede realizarse también con un cultivo continuo. Los cultivos contiguos son sistemas abiertos en los cuales se añade continuamente un medio de cultivo definido a un biorreactor y se retira simultáneamente una cantidad igual de medio acondicionado para su procesamiento. Los cultivos continuos mantienen generalmente las células a una densidad alta constante de la fase líquida, en la que las células se encuentran fundamentalmente en fase de crecimiento logarítmico. Alternativamente, el cultivo continuo puede practicarse con células inmovilizadas en los casos en que se añaden continuamente carbono y nutrientes, y los productos valiosos, sub-productos o productos de desecho se retiran continuamente de la masa de células. La inmovilización de las células puede realizarse utilizando una extensa gama de soportes sólidos compuestos por materiales naturales y/o sintéticos como es conocido por una persona experta en la técnica.
- El cultivo contiene o semicontinuo permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afecten al crecimiento celular, el metabolismo, o la concentración de producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante tal como el nivel de fuente de carbono o nitrógeno a una tasa fija y permita la moderación de todos los parámetros restantes. En otros sistemas, cierto número de factores que afecten al crecimiento o el metabolismo pueden alterarse continuamente mientras que se mantiene constante la concentración de células, medida por la turbidez del medio. Los sistemas continuos procuran mantener las condiciones de crecimiento en estado estacionario y, por tanto, la pérdida de células debida al medio que se retira tiene que compensarse contra la tasa de crecimiento celular en el cultivo. Los métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para procesos de cultivo continuo así como las técnicas para maximizar la tasa de formación de producto son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial, y una diversidad de métodos han sido detallados por Brock, *supra*.
- Particularmente adecuado para la producción de etanol es un régimen de fermentación como sigue. La cepa deseada de *Z. mobilis* modificada en himA que utiliza xilosa se deja crecer en matraces de sacudidas en un medio semicomplejo aproximadamente a 30°C hasta aproximadamente 37°C con agitación mediante sacudidas a aproximadamente 150 rpm en una máquina de sacudidas orbitales y se transfiere luego a un fermentador de siembra de 10 litros que contiene un medio similar. El cultivo de siembra se deja crecer anaeróbicamente en el fermentador de siembra hasta que la DO₆₀₀ está comprendida entre 3 y 6, momento en el que se transfiere la misma al fermentador de producción, en el que se optimizan los parámetros de fermentación para la producción de etanol. Los volúmenes típicos de inóculo transferidos desde el depósito de siembra al depósito de producción varían desde aproximadamente 2% a aproximadamente 20% v/v. El medio típico de fermentación contiene componentes mínimos de medio 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 compleja de nitrógeno tal como extracto de levadura o productos basados en soja (0-10 g/l). Una concentración final de sorbitol o manitol aproximadamente 5 mM está presente en el medio. Azúcares mixtos que incluyen xilosa y al menos un azúcar adicional tal como glucosa (o sacarosa), que proporcionan una fuente de carbono, se añaden continuamente a la vasija de fermentación a medida del agotamiento de la fuente de carbono cargada inicialmente (50-200 g/l) para maximizar la tasa y el título de etanol. Las tasas de alimentación de la fuente de carbono se ajustan dinámicamente para asegurar que el cultivo no acumule glucosa en exceso, lo cual podría conducir a una acumulación de subproductos tóxicos tales como ácido acético. Con objeto de maximizar el rendimiento de etanol producido a partir del sustrato utilizado, se restringe el crecimiento de la biomasa por la cantidad de fosfato que se introduce inicialmente en el lote o que se añade durante el curso de la fermentación. El pH del caldo de fermentación se controla/mantiene por adición automática de base utilizando hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, u otras bases fuertes. La temperatura del fermentador se controla en el intervalo deseado. Con objeto de minimizar la formación de espuma, se añaden a la vasija en caso necesario agentes antiespumantes (cualesquiera basados en clases de silicona, basados en compuestos orgánicos, etc). Un antibiótico, para el cual existe en la cepa un marcador de resistencia a antibióticos, tal como kanamicina, puede utilizarse opcionalmente para minimizar la contaminación.
- Cualquier conjunto de las condiciones arriba descritas, y variaciones adicionales en estas condiciones que son bien conocidas por los expertos en la técnica, son condiciones adecuadas para producción de etanol por las presentes cepas de *Zymomonas* recombinantes modificadas en himA que utilizan xilosa.

Ejemplos

- La presente invención se define adicionalmente en los Ejemplos que siguen. Debe entenderse que estos Ejemplos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración. A partir de la exposición anterior y de estos Ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de esta invención, y puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

MÉTODOS GENERALES

- Los métodos estándar de DNA recombinante y clonación molecular utilizados en esta memoria son bien conocidos en la técnica y han sido descritos por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (en lo sucesivo "Maniatis"); y por Silhavy, T. J., Bennis, 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), “sec” significa segundo(s), “d” significa día(s), “l” significa litro(s), “ml” significa mililitro(s), “ μ l” significa microlitro(s), “ μ g” significa microgramos, “ng” significa nanogramo(s), “g” significa gramo(s), “mM” significa milimolar, “ μ M” significa micromolar, “nm” significa nanómetro(s), “ μ mol” significa micromoles, “pmol” significa picomol(es), “Cm” significa cloranfenicol, “Cm^r” significa resistente a cloranfenicol, “Spec^r” significa resistencia a espectinomicina, “cfu” significa unidades formadoras de colonias, “DO₆₀₀” 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

10 Generación de una biblioteca de silenciación/sobreexpresión de ZW801-4 basada en transposón

Se construyó una biblioteca genómica de silenciación/sobreexpresión basada en transposón en una cepa recombinante de *Z. mobilis* que utilizaba xilosa para cribado de mutantes resistentes al acetato. Había dos razones principales para utilizar un transposón a fin de generar la biblioteca. En primer lugar, es un método carente totalmente de sesgo que no requiere conocimiento previo alguno 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, dado que está “etiquetado” con un marcador seleccionable.

La cepa que se utilizó para generar la biblioteca era ZW801-4. Como se describe en detalle en la Solicitud de Patente U.S. #60/847813, ZW801-4 se derivaba de ZW658 (ATCC#PTA-7858) a través de una cepa intermedia, ZW800. La última cepa se construyó por inserción con entrecruzamiento doble de un plásmido suicida de una casete de resistencia a espectinomicina (casete Spec^r), flanqueada por sitios loxP de tipo salvaje, en el gen codificante de glucosa-fructosa-oxidoreductasa (GFOR). Se demostró que el mutante de silenciación GFOR resultante exhibía una producción reducida de xilitol, un sub-producto perjudicial del metabolismo de la xilosa, y mejor producción de etanol durante la fermentación de azúcares mixtos con glucosa y xilosa. Se convirtió luego ZW800 en ZW801-4 por escisión mediada por Cre de la casete Spec^r. La eliminación del marcador seleccionable dejaba un solo sitio loxP de tipo salvaje en el centro del marco de lectura abierto GFOR, lo cual dio como resultado un codón deparada en marco que trunca prematuramente la traducción de la proteína. Adicionalmente, la secuencia codificante de GFOR en ZW801-4 carece de ~72 pb de la secuencia de nucleótidos GFOR original de tipo salvaje en la región que rodea el sitio loxP como resultado del diseño del constructo suicida. La secuencia de la región codificante de GFOR mutante en ZW801-4 se da como SEQ ID NO: 25. Al igual que su predecesor inmediato (ZW800), ZW801-4 no genera xilitol detectable alguno, dado que no produce una enzima GFOR funcional.

La metodología que se utilizó para generar la biblioteca genómica de silenciación/sobreexpresión de ZW801-4 estaba basada en la tecnología del transposoma Epicentre (Madison, WI) utilizando el Vector de Construcción de Transposones pMODTM-2<MCS> (Cat. No. MOD0602). Este plásmido incluye un gen de resistencia a ampicilina (amp^R), un origen de replicación de *E. coli* (ori), y un sitio de clonación múltiple que está situado entre los dos extremos en mosaico (ME) con los cuales interacciona la transposasa Tn5.

Para aplicación en la presente invención, pMODTM-2<MCS> se convirtió en pMODgap/aadA, representado en la Figura 2, por inserción de una casete Spec^r (que tiene su propio promotor) y el promotor constitutivo fuerte para el gen de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Pgap) de *Z. mobilis* en el sitio de clonación múltiple que está situado entre los dos MEs; el promotor Pgap y la casete Spec^r están orientados en direcciones opuestas. Así, el fragmento de DNA que se insertó aleatoriamente en el cromosoma de *Z. mobilis* durante la transposición utilizando este constructo contenía a la vez la casete Spec^r y el promotor Pgap. El promotor Pgap se añadió al transposón para aumentar la diversidad genética de la biblioteca, dado que el mismo puede alterar potencialmente la expresión de los genes cromosómicos de *Z. mobilis* que están situados adyacentes al sitio de inserción del transposón.

La biblioteca genómica de silenciación/sobreexpresión de ZW801-4 estaba constituida por ~17.500 mutantes independientes y el título del stock de glicerol era ~7,1 x 10⁸ unidades formadoras de colonias (cfu) Spec^r por mililitro. Esto se traduce en ~1 evento de inserción de transposón/115 nucleótidos, lo cual es aproximadamente 8x la cobertura del genoma total, basado en la inserción aleatoria del transposón y ~2000 genes con un tamaño medio de ~1 kb. Debido a la baja frecuencia de transformación de *Z. mobilis*, era de esperar que ninguno o muy pocos de los mutantes tuvieran más de una inserción del transposón.

Ejemplo 2

Cribado de la biblioteca de silenciación/sobreexpresión basada en transposón de ZW801-4 respecto a mutantes con mayor tolerancia al acetato

La biblioteca genómica de silenciación/sobreexpresión de ZW801-4 se cribó respecto a mutantes resistentes a acetato como se describe a continuación. Sin embargo, antes de hacer esto era importante ajustar las condiciones de selección apropiadas para el proceso de enriquecimiento de mutantes. El objetivo era encontrar una concentración de acetato que ralentizara la tasa de crecimiento por al menos un factor de 2, pero que permitiera todavía que las células se dividieran durante varias generaciones a fin de que pudieran acumularse mutantes de crecimiento más rápido. También era importante realizar esto en condiciones relevantes para el proceso en una

5 mixtura concentrada de glucosa y xilosa, dado que experimentos previos han demostrado que el estrés osmótico y el acetato inhiben ambos el crecimiento de una manera sinérgica. Finalmente, era también crítico el control del pH, dado que el compuesto inhibidor real es ácido acético, y la ratio de la especie protonizada a la especie no protonizada podría aumentar espectacularmente sin control del pH a medida que las células bacterianas acidificaran el medio de crecimiento. Por ejemplo, si el pH descendiera desde 5,8 a 4,8, la concentración de ácido acético aumentaría aproximadamente 5 veces, dado que el pK_a de este ácido orgánico débil es $\sim 4,8$.

10 La Figura 3 muestra los efectos inhibidores de dos concentraciones diferentes de acetato sobre la tasa de crecimiento y el rendimiento final de biomasa de ZW801-4, la cepa que se utilizó para generar la biblioteca. Se utilizó acetato de potasio para estos experimentos, y las concentraciones finales que se dan a continuación están basadas en el componente acetato de la sal añadida en gramos por litro. Los biorreactores de pH controlado contenían medio mRM3S (10 g/l extracto de levadura, 2 g/l K_2HPO_4 , 1 g/l $MgSO_4$, 5 mM sorbitol) más 100 g/l glucosa, 90 g/l xilosa y 5 g/l o 6 g/l acetato; el pH y la temperatura eran 5,8 y 30°C, y la agitación se mantuvo a 150 rpm. Basándose en los resultados que se presentan en la Figura 3 y otros experimentos, se seleccionó 5 g/l acetato para cribado de la biblioteca, dado que esta concentración del inhibidor satisfacía ambos criterios para crecimiento como se ha expuesto anteriormente.

15 Para enriquecimiento de mutantes resistentes al acetato, se utilizó el protocolo siguiente. Se añadió una parte alícuota (2 ml) del stock de glicerol de la biblioteca ($DO_{600} = 4,3$; $\sim 7,1 \times 10^8$ Spec^f cfu/ml) a 20 ml de medio SM (10 g/l extracto de levadura, 2 g/l K_2HPO_4 , 1 g/l $MgSO_4$, 75 g/l glucosa, 25 g/l xilosa, pH inicial 5,8) y el cultivo se incubó durante 1,5 horas a 30°C. Después de este periodo de recuperación, se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en 2,0 ml del mismo medio de crecimiento. Una parte alícuota (10 μ l) de la suspensión de células ($\sim 7 \times 10^8$ Spec^f cfu) se inoculó luego en 15 ml de medio mRM3S que contenía 100 g/l glucosa, 90 g/l xilosa, y 4 g/l bicarbonato de potasio para ayudar a minimizar los cambios de pH; el pH inicial se ajustó a 5,8 con ácido fosfórico concentrado antes de añadir las células, y la DO_{600} inicial era $\sim 0,0025$. Este fue el cultivo de siembra que se utilizó para el procedimiento de enriquecimiento de mutantes. El mismo se dejó crecer a 30°C hasta DO_{600} de $\sim 0,5$ y se inocularon luego 7,5 ml en un biorreactor de pH controlado. El cultivo final de 150 ml contenía medio mRM3S más 100 g/l glucosa, 90 g/l xilosa, 5 g/l acetato, y el pH se mantuvo a 5,8 por adición automática de KOH. Después de ~ 24 horas de crecimiento a 30°C, se transfirió una parte alícuota del cultivo ($DO_{600} \sim 0,5$) a un nuevo biorreactor que contenía medio de crecimiento nuevo con la misma composición a una DO_{600} inicial de $\sim 0,02$. Este paso se repitió 6 veces más, esencialmente como se ha descrito arriba. En general, las células se transfirieron cada 24-36 horas y la DO inicial en el biorreactor era $\sim 0,02$ a $\sim 0,03$. Así pues, existían al menos 5 generaciones entre las transferencias. Después de la séptima tanda del procedimiento de enriquecimiento de mutantes, se preparó un stock de glicerol del cultivo para caracterización ulterior.

20 La Figura 4A muestra los resultados de un experimento en biorreactor de pH controlado con alto contenido 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 dejaron crecer a 30°C en medio SM hasta una DO_{600} de $\sim 4,5$, y los biorreactores se pusieron en marcha con 10% de inóculo. Los cultivos finales de 150 ml contenían medio mRM3S más 100 g/l glucosa, 90 g/l xilosa y 6 g/l acetato. La agitación se ajustó a 150 rpm, y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 30°C, respectivamente. En diversos momentos, se retiraron partes alícuotas de 1,0 ml de los cultivos para análisis por HPLC utilizando un HP1100 equipado con un detector de índice de refracción (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) a fin de determinar las concentraciones de glucosa, xilosa, y etanol que estaban presentes en el caldo de fermentación. Antes del análisis por HPLC, se retiraron las células por centrifugación y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de tubo de centrifuga Spin-X de acetato de celulosa de 0,22 μ m (Costar, número de catálogo 8160) para eliminar las partículas pequeñas. Los compuestos se separaron en una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad), que se puso en funcionamiento a 55°C en condiciones isocráticas utilizando un caudal de 0,6 ml/min y H_2SO_4 0,01 N como la fase móvil. Se utilizaron estándares auténticos de concentración conocida para cuantificar los picos de interés, y los resultados se expresaron en g/l.

25 Los resultados dados en la Figura 4A demuestran que el cultivo de la biblioteca enriquecida en mutantes tenía una utilización más rápida de xilosa y una producción más rápida de etanol durante la última etapa de la fermentación. Obsérvese que esto ocurría después que la totalidad de la glucosa se había agotado y la concentración de etanol se aproximaba a niveles tóxicos. Sin embargo, hacia finales del experimento, ambos cultivos habían consumido la totalidad del azúcar y producían la misma cantidad de etanol. Cuando se repitió este experimento utilizando una concentración ligeramente mayor de azúcar (105 g/l glucosa y 100 g/l xilosa) y más acetato (9 g/l), se observó un fenómeno similar (Fig. 4B), demostrando así que los resultados eran reproducibles.

Ejemplo 3

55 Caracterización Genética de las Cepas Mutantes

60 Para ver en qué tipos de mutantes se producía el enriquecimiento durante el proceso de selección, se aislaron colonias simples del cultivo de la biblioteca durante el experimento en el segundo biorreactor (Figura 4B). Una parte alícuota del cultivo se separó al cabo de 24 horas y las células se dejaron crecer en placas de agar que contenían medio MMG (50 g/l glucosa, 10 g/l extracto de levadura, 5 g/l triptona, 2,5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/l K_2HPO_4 , y $MgSO_4$ 1 mM). Después de un periodo de incubación de 48 horas a 30°C en condiciones anaerobias, 17 de las colonias

resultantes se seleccionaron aleatoriamente para análisis de la secuencia de DNA a fin de determinar el o los sitios de inserción del transposón. Para este análisis se utilizó el procedimiento siguiente. Las colonias se diluyeron en 50 µl de agua y se amplificó el DNA genómico utilizando el Kit de Amplificación GenomiPHI (GE Healthcare Life Sciences Cat. No. 25-6600-1). Resumidamente, se añadió 1 µl de la suspensión de células a 9 µl del Reactivo de Lisis y la mixtura se calentó a 95°C durante 3 min y se enfrió inmediatamente a 4°C. A continuación, se añadieron 9 µl de Tampón Enzimático y 1 µl de DNA-polimerasa Phi 29 a las muestras lisadas. Después de 18 horas de amplificación a 30°C, la polimerasa se desactivó por calentamiento durante 10 min a 65°C y la muestra se enfrió inmediatamente después a 4°C.

Se añadió luego una parte alícuota de la muestra amplificada (8 µl) a 16 µl de Reactivo de Secuenciación BigDye v3.1 (PN #4337457 Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 µl de Thermofidelsa (Fidelity Systems, Gaithersburg, MD), 12 µl de agua de Grado Biología Molecular (Mediatech Inc., Herndon, VA), y 3 µl de cebador 10 µM (o bien SpecT-FOR (SEQ ID NO: 2: GTGAAAGCGAGATCACCAAGGTAGTC) o SpecT-Rev (SEQ ID No: 3: CTACCTCTGATAGTTGAGTCGATACTTCGG)). Obsérvese que ambos cebadores citados se hibridan a la casete Spec^r que forma parte del transposón que se utilizó para generar la biblioteca genómica de silenciamiento DE ZW801-4, pero están orientados en direcciones opuestas. Las reacciones de secuenciación se sometieron luego a ciclos térmicos como sigue: 3 min a 96°C seguido por 200 ciclos de (95°C 30 s + 55°C 20 s + 60°C 2 min) y se guardaron a 4°C. Antes de la secuenciación, se eliminaron los ddNTPs no incorporados utilizando placas limpiadoras Edge Biosystems (Gaithersburg, MD). La mixtura de la reacción de secuenciación completa de 40 µl se pipeteó en un pocillo de una placa limpiadora de 96 pocillos previamente centrifugada, y la placa se centrifugó durante 5 min a 5000 x g en una centrifuga Sorvall RT-7 refrigerada. Las reacciones limpiadas se pusieron luego directamente en un secuenciador de DNA Applied Biosystems 3730 y se secuenciaron con requerimiento automático de bases.

Es notable que la totalidad de las 17 colonias que se secuenciaron tenían un transposón insertado en el marco de lectura abierto *himA* (complemento inverso de los nucleótidos #1138224 a 1138565 del genoma de *Z. mobilis* (número de acceso a GenBank AE008692)), y se identificaron 3 eventos de inserción diferentes. Once de las colonias (con inclusión de AcR#3, véase más adelante) tenían un inserto de transposón en el nucleótido #1138413, cuatro de las colonias tenían un inserto en el nucleótido #1138267, y dos de las colonias tenían un inserto en el nucleótido #1138508. Así pues, los tres eventos de inserción ocurrían dentro de un tramo de 250 pb del DNA. El hecho de que el 65% de los mutantes de *himA* silenciados tuvieran un inserto de transposón en el nucleótido #1138413 después de la séptima tanda del procedimiento de enriquecimiento en mutantes sugería que este evento puede haber conferido un crecimiento más rápido o mayor supervivencia que los otros dos eventos de inserción. Se deducía también otra observación interesante del análisis de la secuencia. Aunque en teoría un transposón Tn5 puede insertarse por sí mismo en el DNA en cualquier dirección, los tres eventos de inserción que se recuperaron del proceso de selección tenían la misma orientación, apuntando el promotor P_{gap} en la dirección opuesta del marco de lectura abierto de *himA*.

Por los resultados de secuenciación arriba descritos, está claro que los experimentos que se presentan en la Figura 4 se realizaron con una población de células mixta, no con una cepa purificada. Por ello, se seleccionó AcR#3 para caracterización ulterior del fenotipo *himA*, dado que esta cepa tiene un transposón insertado en el nucleótido #1138413, que era el evento aislado más frecuentemente.

Ejemplo 4

Efecto de la desactivación del gen *himA* sobre la tolerancia al acetato y la eficiencia de fermentación en condiciones relevantes del proceso

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

El medio de crecimiento que se utilizó para el proceso de selección de mutantes contenía concentraciones elevadas de glucosa y xilosa, además de un nivel inhibitorio de acetato. Por tanto, era posible que la eficiencia mejorada de fermentación que se observó después de la séptima tanda de enriquecimiento (Figura 4) estuviera relacionada con el estrés osmótico o con un mejor crecimiento en xilosa, dado que este azúcar no se utiliza tanto como la glucosa. Era posible también que se hubiera producido enriquecimiento en mutantes resistentes al etanol, dado que los mismos crecerían también presumiblemente con mayor rapidez o sobrevivirían durante mayor tiempo en las condiciones experimentales empleadas. Para descartar estas otras posibilidades y ver si la desactivación del gen *himA* confiere realmente mayor tolerancia al acetato, se comparó la cepa AcR#3 con la cepa parental, ZW801-4 en las condiciones siguientes. El experimento se realizó a 33°C en matraces de sacudidas (cultivos de 20 ml en tubos de 50 ml), y el medio de crecimiento contenía 10 g/l extracto de levadura, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄, KHCO₃ mM (para ayudar a mantener el pH), 50 g/l glucosa y 0, 8, ó 12 g/l acetato, que se añadió como la sal de potasio; las concentraciones de acetato que se indican 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 una máquina de sacudidas recíprocas (150 rpm). Los cultivos de siembra se dejaron crecer hasta la fase exponencial tardía (DO₆₀₀ ~1,4) en el mismo medio sin acetato y la DO₆₀₀ inicial para los cultivos experimentales era 0,03. Es importante observar que estas son condiciones ideales para el crecimiento de *Z. mobilis* en ausencia de acetato, dado que no existe estrés osmótico alguno y el sustrato glucosa preferido que es la fuente de carbono. Inicialmente,

la concentración máxima de etanol que podría generarse en este experimento es < 25 g/l, lo cual tiene poco o ningún efecto sobre el crecimiento de *Z. mobilis*.

En ausencia de acetato, AcR#3 y ZW801-4 crecían con cinética similar y producían la misma cantidad de biomasa a juzgar por los valores finales de DO₆₀₀ que se presentan en la Figura 5. La cepa AcR#3 (Figura 5B), sin embargo, tenía una tolerancia mucho mayor para el acetato que la cepa parental (Figura 5A). Por ejemplo, el crecimiento de ZW801-4 era anulado casi totalmente por 8 g/l acetato, mientras que esta concentración de inhibidor tenía un efecto insignificante sobre AcR#3. De hecho, el mutante silenciado *himA* era más resistente a 12 g/l acetato que lo era ZW801-4 a 8 g/l acetato. Este experimento se repitió y se obtuvieron los mismos resultados. Es importante llamar la atención sobre el hecho de que el acetato es mucho más inhibidor cuando el pH del medio de crecimiento no está controlado, como ocurría en los experimentos de biorreactor que se presentan en la Figura 4. En los experimentos de matraces de sacudidas sin control de pH, las células acidifican el medio de crecimiento y la ratio de ácido acético/acetato aumenta espectacularmente, siendo la especie protonizada la que inhibe el crecimiento bacteriano como ya se ha indicado.

Aunque los iones potasio podrían haber contribuido al menos parcialmente a la inhibición del crecimiento que se observaba para ambas cepas en el experimento anterior, era importante testar otras fuentes de acetato. Las condiciones que se utilizaron para este conjunto de experimentos eran idénticas a las arriba descritas, pero se incluyeron también en el análisis acetato de sodio y acetato de amonio. La concentración del anión acetato era 8 g/l (como se ha definido arriba) en todos los casos. En la Figura 6 se representan los valores finales de DO₆₀₀ para los diversos cultivos al cabo de 43 horas. ZW801-4 (Fig. 6A) era fuertemente inhibido por 8 g/l acetato, con indiferencia de la sal acetato que se utilizara. Esta observación indica claramente que el inhibidor principal de estos experimentos era ácido acético, y que los cationes monovalentes en las sales acetato tenían poco o ningún efecto sobre el crecimiento a las concentraciones que se utilizaron. Aunque las tres sales acetato tenían también un impacto negativo sobre el crecimiento de AcR#3 (Fig. 6B) la inhibición con esta cepa no era tan espectacular cuando la concentración de acetato era sólo 8 g/l. Tomados en su conjunto, los experimentos que se presentan en las Figuras 5 y 6 proporcionan una eficiencia inequívoca de que AcR#3 es mucho más resistente al acetato que la cepa parental, ZW801-4.

AcR#3 se comporta mejor en una mixtura rica en azúcar más acetato que ZW801-4

Cuando se testó AcR#3 en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para la "población mixta" de mutantes (Figura 4B), el mismo sobrepasaba a ZW801-4 y había una diferencia mucho mayor entre los dos cultivos que la existente en el experimento anterior (Figura 7). Consistentemente con los resultados previos, la mejora era sólo evidente durante la última fase de la fermentación después que se había consumido la totalidad de la glucosa y la única fuente de carbono remanente era xilosa. De hecho, una inspección minuciosa de las evoluciones temporales que se presentan en la Figura 7 revelaba que las tasas iniciales de utilización de glucosa y producción de etanol eran ligeramente más lentas para AcR#3. Sin embargo, después que se hubo consumido totalmente la glucosa, está claro por las pendientes de las curvas de utilización de xilosa que AcR#3 era capaz de convertir este azúcar en etanol a un ritmo más rápido que ZW801-4 durante la última fase de la fermentación.

El potencial pleno de AcR#3 no pudo evaluarse en el experimento arriba descrito, dado que incluso la cepa de control era capaz de utilizar la totalidad del azúcar hacia el final del experimento en las condiciones empleadas. Para eliminar esta limitación, se testaron de nuevo AcR#3 y ZW801-4 utilizando condiciones que eran más exigentes. La temperatura se elevó de 30°C a 33°C y se utilizó una mayor concentración de glucosa y xilosa. Los cultivos de siembra se dejaron crecer a 30°C en medio SM hasta una DO₆₀₀ de ~4,4 y se utilizó 10% de inóculo para poner en marcha los biorreactores. Los cultivos finales de 150 ml contenían medio mRM3S + 126 g/l glucosa, 107 g/l xilosa y 10 g/l 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 condujo por triplicado para ZW801-4 y por duplicado para AcR#3, y los valores de punto final (al cabo de 67 horas) para glucosa, xilosa, acetato y etanol (valor medio ± SE) se dan en la Tabla 1. El análisis por HPLC del caldo de fermentación fue como se describe en el Ejemplo 2 y las concentraciones para todos los compuestos en la tabla se expresan en g/l. En estas condiciones más severas, AcR#3 consumía ~10% más xilosa y producía ~4% más etanol que la cepa parental, ZW801-4.

Tabla 1. Valores de punto final para xilosa, etanol y xilitol en fermentadores de pH controlado con las cepas ZW801-4 y AcR#3 cultivadas en condiciones elevadas de azúcar y acetato

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

AcR#3 se comporta mejor que ZW801-4 en hidrolizado falso 100%

Se evaluaron los comportamientos de AcR#3 y ZW801-4 en presencia de concentraciones de iones amonio y acetato que se espera estén presentes en hidrolizado de la biomasa producido utilizando un proceso de

- 5 pretratamiento con hidróxido de amonio. Éste era un experimento crítico, dado que se ha estimado que la concentración de iones amonio durante la fermentación del hidrolizado de forraje de maíz pretratado con hidróxido de amonio puede exceder de 180 mM, y concentraciones elevadas de iones amonio inhiben el crecimiento de *Z. mobilis* (Agrawal (1989) *Biotechnology and Bioengineering* 34: 278-281). El medio Hidrolizado Simulado 100% sintético (100% MH) que se utilizó para estos experimentos contiene 5 g/l extracto de levadura, (NH₄)₂HPO₄ 15 mM, acetato de amonio 160 mM, 1 g/l MgSO₄ y sorbitol 10 mM (pH 5,8). Así, las concentraciones finales de iones acetato y amonio en MH 100% después de adición de los cultivos de siembra eran ~9,5 g/l y 190 mM, respectivamente. Los experimentos se condujeron en biorreactores de pH controlado. Los cultivos de siembra se dejaron crecer a 30°C en medio SM hasta una DO₆₀₀ de ~4,4, y se utilizó 10% de inóculo para poner en marcha los biorreactores. Los cultivos de 150 ml finales contenían MH 100% + 110 g/l glucosa y 90 g/l xilosa. Se ajustó el agitador a 150 rpm, y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 33°C, respectivamente. En diversos momentos, se retiraron partes alícuotas para análisis HPLC del caldo de fermentación utilizando el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 2. Los resultados de un par de experimentos representativos que se condujeron al mismo tiempo se presentan en la Figura 8: ZW801-4 en 8A, y AcR#3 en 8B.
- 15 Consistentemente con las observaciones anteriores, la cepa AcR#3 no tenía una tasa aumentada de producción de etanol cuando el único azúcar que se metabolizaba era glucosa. Sin embargo, la eficiencia superior de AcR#3 era muy evidente durante la última etapa de la fermentación cuando la única fuente de carbono remanente era xilosa. Cuando ZW801-4 había consumido la totalidad de la glucosa, la concentración de etanol era ya > 65 g/l, que es una concentración bactericida incluso para *Z. mobilis*. La A este ambiente severo se sumaban las altas concentraciones de iones acetato y amonio, que potencian ambas la toxicidad del etanol. A medida que continuaba aumentando el nivel de etanol, el metabolismo de la xilosa se ralentizaba cada vez más, y finalmente llegó a un punto muerto. El mismo escenario se produjo con AcR#3, pero el periodo de tiempo se prolongó. Dado que AcR#3 es más resistente al acetato, pudo sobrevivir durante más tiempo en el ambiente tóxico, y fue por tanto capaz de consumir virtualmente la totalidad de la xilosa en el medio de crecimiento y producir más etanol que ZW801-4.
- 25 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 da en la Tabla 2 utilizando valores de punto final (al cabo de 48 horas) para glucosa, xilosa, acetato y etanol; todas las concentraciones se expresan en g/l (valor medio ± SE). Cada uno de los seis biorreactores se inoculó con un cultivo de siembra dejado crecer independientemente. En 100% MH, AcR#3 consumía ~14 g/l más xilosa que ZW801-4 y esto aumentaba el título final de etanol desde 82 g/l a 91 g/l, lo cual es un aumento mayor que 10%. Estos resultados son aún más espectaculares que los obtenidos en los experimentos con contenidos elevados de azúcar más acetato dados en la Tabla 1. Cuando están presentes iones amonio en el medio de crecimiento con acetato, el nivel de estrés se eleva hasta un nivel mayor aún y los beneficios de la desactivación del gen *himA* se hacen aún más evidentes. Obviamente, una cepa como AcR#3 que tiene mayor tolerancia para el acetato está mejor equipada para competir con los otros inhibidores en su ambiente, como el etanol y los iones amonio.

Tabla 2. Valores de punto final para glucosa, xilosa, etanol, y acetato en fermentadores de pH controlado con las cepas ZW801-4 y AcR#3 desarrolladas en 100% Hidrolizado Simulado 100%.

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

Ejemplo 5

Generación de un constructo suicida para silenciamiento del gen *himA* en ZW801-4

- 40 Aunque los resultados presentados hasta ahora sugieren fuertemente que el fenotipo de AcR#3 resistente al acetato era resultado de la interrupción del gen *himA*, podrían haber contribuido potencialmente dos factores adicionales. Como se describe en el Ejemplo 1, el transposón que se utilizó para generar la biblioteca genómica de silenciamiento/sobreexpresión de ZW801-4 contenía una casete Spec^r y el promotor P_{gap} 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. Dado que el promotor P_{gap} de *Z. mobilis* es un promotor constitutivo fuerte, podría haber alterado el nivel de presión de los genes que están en proximidad estrecha al sitio de inserción de transposón *himA*. Es también imaginable que al menos parte del fenotipo de AcR#3 resistente al acetato fuera resultado de mutaciones espontáneas en otros genes que pueden haberse dejado crecer más rápidamente durante el proceso de enriquecimiento en mutantes de la biblioteca (Ejemplo 2). Para descartar estas posibilidades y ver si la desactivación del gen *himA* es únicamente responsable de la mayor tolerancia de AcR#3 al acetato, se diseñó un constructo suicida para silenciar el gen *himA* en ZW801-4. Este plásmido no replicante tiene una casete de resistencia a espectinomicina, pero no contiene un promotor P_{gap} como se describe con mayor detalle más adelante.

El constructo suicida que se utilizó en la presente invención para silenciar el gen *himA* en ZW801-4 ("pHimA") se derivaba finalmente de otro constructo suicida ("pLDHSp-9WW") que se utilizó previamente para desactivar por inserción el gen de D-lactato-deshidrogenasa en *Z. mobilis* utilizando recombinación homóloga con entrecruzamiento doble mediada por el hospedador y resistencia a espectinomicina como marcador seleccionable. pLDHSp-9WW se derivaba también de varios otros constructos que se generaron previamente. El precursor inicial para todos estos constructos era el vector de plásmido pNEB193 (New England Biolabs #N3051S) que está disponible comercialmente. Este plásmido se seleccionó debido a que puede replicarse en *E. coli* pero no puede replicarse en *Z. mobilis*. Todos estos pasos y compuestos intermedios que estaban implicados en la generación del constructo de silenciamiento de *himA* se describen a continuación por orden cronológico comenzando con el plásmido pNEB193.

10 Construcción de pLDH193

Se sometió pNEB193 a doble digestión con SbfI y Ascl para inserción del fragmento de DNA que se describe a continuación. Ambos sitios de restricción son singulares y están localizados en la región de clonación múltiple del plásmido. El fragmento de DNA del plásmido pNEB193 linealizado con SbfI/Ascl se purificó utilizando el Kit de Purificación QIAQuick de Qiagen (catálogo #28104) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El inserto de DNA que se clonó en pNEB193 era un fragmento de 2268 pb que se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *Z. mobilis* que se aisló de la cepa ZW1 (ATCC #31821) utilizando el Kit Blood & Cell Culture Maxi de Qiagen (catálogo #13362). Los oligonucleótidos sintéticos que se utilizaron para la amplificación PCR de este fragmento eran los Cebadores 1 y 2.

Cebador 1 (SEQ ID NO:4)

CTACTCATTTCctgcaggIGGTA~~ACTCATTGCGCGCTC~~

Cebador 2 (SEQ ID NO:5)

CATCTTACTggcgcgccAAAAATCTGCGGCTGACATAC

20 Las bases subrayadas del Cebador 1 (cebador directo) se hibridan a los nucleótidos 1.262.739-1.262.720 del genoma de *Z. mobilis* (número de acceso a GenBank AE008692) en el extremo 3' del marco de lectura abierto que codifica fosfogliceromutasa (*pgm*), mientras que las letras minúsculas corresponden a un sitio SbfI que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas del Cebador 2 (cebador inverso) se hibridan a los nucleótidos 1.260.490-1.260.472 del genoma de *Z. mobilis*, que se encuentra inmediatamente aguas arriba del marco de lectura abierto que codifica la alcohol-deshidrogenasa I (*adhI*), mientras que las letras minúsculas corresponden a un sitio Ascl que se añadió al extremo 5' del cebador. Así pues, el fragmento de DNA de 2268 pb que era la diana para la amplificación PCR está constituido por los elementos siguientes comenzando en el sitio SbfI y terminando en el sitio Ascl: (a) el extremo 3' del gen *pgm*, (b) el gen *ldh* entero que codifica D-lactato-deshidrogenasa, y (c) una región 5' no traducida del gen *adhI*. El producto PCR se cortó con SbfI y Ascl, y el fragmento de DNA resultante se ligó al vector pNEB193 linealizado con SbfI/Ascl que se describió anteriormente. La mixtura de la reacción de ligación se utilizó para transformar *E. coli* JM110 y las células transformadas se extendieron en placas en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml). Los transformantes resistentes a la ampicilina que contenían plásmidos con el inserto de tamaño correcto se identificaron inicialmente por PCR utilizando colonias resuspendidas ("PCR de colonias") y los Cebadores 1 y 2. La confirmación subsiguiente de clones positivos se obtuvo del análisis de digestión por restricción del DNA plasmídico con SbfI y Ascl, y el análisis de la secuencia de DNA del fragmento de 2268 pb que se generó por PCR de colonias con los transformantes resistentes a ampicilina. El plásmido que se seleccionó para manipulación ulterior se designó pLDH193.

Construcción de pLDHTc139#7

40 El plásmido pLDH193 tiene un sitio NcoI singular que está localizado aproximadamente en el centro del marco de lectura abierto de *ldh*. Este sitio se utilizó para insertar un fragmento de DNA que confiere resistencia a tetraciclina. La casete de resistencia a tetraciclina (casete Tc^r) que se utilizó para esta manipulación fue generada por PCR utilizando el plásmido pACYC184 (número de acceso a GenBank X06403) como un molde de DNA y los cebadores 3 y 4 como cebadores PCR.

Cebador 3 (SEQ ID NO:6):

ACTCATTTCcatggCGATCGCACTATg~~cggccgc~~AATGTAGCACCTGAAGTCAGC

C

Cebador 4 (SEQ ID NO:7):

ATCTCACTccatggCCGGCCAACTAttaattaaGAATTGATTGGCTCCAATTCTTG

Las bases subrayadas en negrita del Cebador 3 (cebador directo) se hibridan inmediatamente aguas arriba del promotor para el gen de resistencia a tetraciclina. El Cebador 3 tiene también 3 sitios de restricción (NcoI, AsiSI, y NotI) que se añadieron a su extremo 5'. El sitio NcoI se escribe en letras minúsculas normales. El sitio AsiSI está subrayado con una línea delgada. El sitio NotI está escrito en letras cursivas minúsculas. Las bases subrayadas en negrita del Cebador 4 (cebador inverso) se hibridan inmediatamente aguas abajo del codón de parada para el gen de resistencia a tetraciclina, y este cebador tiene también 3 sitios de restricción (NcoI, FseI, y PacI) que se añadieron a su extremo 5'. Análogamente a la marcación anterior, el sitio NcoI se escribe en letras minúsculas normales, el sitio FseI se subraya con una línea delgada, y el sitio PacI se describe en letras cursivas minúsculas. La casete Tc^r 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 DNA resultante se ligó luego al sitio único NcoI que está presente en el marco de lectura abierto *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 ternero antes de la ligación. La mezcla de la reacción de ligación se introdujo en *Escherichia coli* JM110 y las células transformadas se extendieron en placas sobre medio LB que contenía 20 µg/ml de tetraciclina. Los transformantes resistentes a la tetraciclina que contenían plásmidos con la inserción correcta se identificaron por análisis de digestión por restricción con NcoI, AsiSI, NotI, FseI, y PacI, y la orientación de la casete Tc^r se confirmó por análisis PCR utilizando cebadores apropiados. Un diagrama circular del plásmido que se seleccionó para manipulación ulterior (designado pLDHTc139#S) se muestra en la Figura 9A. En otro proyecto, este constructo suicida se utilizó con éxito para desactivación por inserción (para "interrupción" o "silenciación" del gen de D-lactato-deshidrogenasa en ZW1 utilizando recombinación homóloga de entrecruzamiento doble mediada por el hospedador y crecimiento en tetraciclina como el marcador seleccionable.

Construcción de pLDHTc139#7-9 WW

Una vez demostrado que podría utilizarse pLDHTc139#7 para "silenciar" el gen de D-lactato-deshidrogenasa en ZW1, se modificó luego el constructo de tal modo que fuera posible eliminar el marcador seleccionable del cromosoma después de la interrupción del gen, utilizando la recombinasa Cre. Para conseguir este objetivo, se añadieron dos sitios loxP de tipo salvaje (Lee y Saito, 1998) a pLDHTc139#7 aprovechando la ventaja de los cuatro sitios de restricción singulares que flanquean la casete Tc^r, a saber, 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 el constructo con ambas enzimas y purificar el fragmento de DNA 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 ambos fosforilados en su extremo 5'.

Oligo 5 (SEQ ID NO:8):

cgcATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATgc

Oligo 6 (SEQ ID NO:9):

ggccgcATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATgcgat

Los oligos 5 y 6 son complementarios uno de otro, y cuando se reasocian juntos forman un sitio loxP bicatenario de tipo salvaje y de longitud total que tiene salientes monocatenarios en ambos extremos, que permiten que el fragmento de DNA se ligue entre los sitios AsiSI y NotI de pLDHTc139#7. Las letras mayúsculas en los oligos 5 y 6 corresponden al sitio loxP de tipo salvaje de longitud total, mientras que las letras minúsculas indican los nucleótidos que se utilizaron para ligar el fragmento de DNA bicatenario a los sitios AsiSI y NotI de pLDHTc139#7.

La mezcla de la reacción de ligación se utilizó para transformar *Escherichia coli* DH10B y las células transformadas se extendieron en placas sobre medio LB que contenía 20 µg/ml de tetraciclina. Los transformantes resistentes a tetraciclina que contenían 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 utilizando cebadores apropiados, y análisis de la secuencia de DNA de las regiones relevantes. El plásmido que se seleccionó para manipulación ulterior se designó pLDHTc139#7-9W.

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

Oligo 7 (SEQ ID NO:10):

taaATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATggccgg

Oligo 8 (SEQ ID NO:11):

ccATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATttaat

Los oligos 7 y 8 son complementarios uno de otro, y cuando se hibridan forman un sitio loxP de tipo salvaje bicatenario y de longitud total que tiene salientes monocatenarios en ambos extremos que permiten que el fragmento de DNA se ligue entre los sitios Pacl y Fsel de pLDHTc139#7-9W. Las letras mayúsculas en los oligos 7 y 8 corresponden al sitio loxP de longitud total, y las letras minúsculas indican los nucleótidos que se utilizaron para ligar el fragmento bicatenario de DNA en los sitios Pacl y Fsel de pLDHTc139#7-9W.

La mixtura de la reacción de ligación se utilizó para transformar *Escherichia coli* DH10B y las células transformadas se extendieron en placas sobre medio LB que contenía 20 µg/ml de tetraciclina. Los transformantes resistentes a tetraciclina que contenían plásmidos con el sitio loxP de tipo salvaje insertado correctamente en los sitios Pacl y Fsel de pLDHTc139#7-9W se identificaron por análisis de digestión por restricción, PCR de colonias utilizando cebadores apropiados, y análisis de la secuencia de DNA de las regiones relevantes. El plásmido que se seleccionó para manipulación ulterior se designó pLDHTc139#7-9WW, y un diagrama circular de este constructo se muestra en la Figura 9B.

Construcción de pLDHSp-9WW

pLDHSp-9WW es idéntico a pLDHTc139#7-9WW, excepto que la casete resistente a tetraciclina en el último constructo se reemplazó con un fragmento de DNA que confiere resistencia a espectinomicina (es decir una casete Spec^r). El último se generó por PCR utilizando en plásmido pHP15578 (descrito en Cahoon et al, 2003) como molde y los cebadores 9 y 10 para amplificación PCR. pHP15578 contiene la secuencia de nucleótidos completa para la casete Spec^r, incluyendo su promotor, que está basado en la secuencia publicada del gen *aadA* del transposón Tn7 (número de acceso a GenBank X03403) que codifica 3' (9)-O-nucleotidiltransferasa.

Cebador 9 (SEQ ID NO:12):

ATAAAAgcggccgcAGCACAGGATGA

Cebador 10 (SEQ ID NO:13):

GGCGTtaattaaGGCAGGTCAGCAAG

Las bases subrayadas del Cebador 9 (cebador directo) se hibridan justamente aguas arriba del promotor de la casete Spec^r (a los nucleótidos 6-17 del número de acceso a GenBank X03403), mientras que las letras minúsculas corresponden al sitio NotI que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas del Cebador 10 (cebador inverso) se hibridan aproximadamente 130 bases aguas abajo del codón de parada para la casete Spec^r (a los nucleótidos 106-1019 del número de acceso a GenBank X03043), mientras que las minúsculas corresponden a un sitio Pacl que se añadió al extremo 5' del cebador. La casete Spec^r de 1040 pb generada por PCR se sometió a doble digestión con NotI y Pacl, y el fragmento de DNA resultante se purificó por electroforesis en gel de agarosa. El plásmido pLDHTc139#7-9WW se cortó también con las mismas dos enzimas de restricción para separar la casete Tc^r, y el fragmento vector grande resultante se purificó por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de PCR y de vector se ligaron luego, y la mixtura de la reacción de transformación se introdujo en *E. coli* DH10B utilizando electroporación. Los transformantes se extendieron en placas sobre medio LB que contenía espectinomicina (200 µg/ml) y se dejaron crecer a 37°C. Los transformantes resistentes a espectinomicina que contenían plásmidos con el inserto de tamaño correcto se identificaron por medio de análisis de digestión por restricción con NotI y Pacl, y el plásmido que se seleccionó para manipulación ulterior se designó pLDHSp-9WW; un diagrama circular de este constructo se muestra en la Figura 9C.

En otro proyecto, se utilizó pLDHSp-9WW para silenciar el gen para D-lactato-deshidrogenasa en ZW1 utilizando recombinación homóloga de doble entrecruzamiento mediada por el hospedador y crecimiento sobre espectinomicina como la selección. El evento de entrecruzamiento doble fue direccionado al gen *ldh* por dos fragmentos de DNA que flanquean la casete Spec^r en el constructo suicida. Uno de estos fragmentos (al que se hace referencia más adelante como DNA flanqueante 5' *ldh*) está justamente aguas arriba de la casete Spec^r y está localizado entre los sitios SbfI y AsiSI. La secuencia de nucleótidos de este fragmento de DNA de ~1100 pb es idéntica al DNA 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 DNA (al que se hace referencia más adelante como el DNA flanqueante 3' *ldh*) está localizado en el extremo opuesto de la casete Spec^r entre los sitios Fsel y AscI. La secuencia de nucleótidos del DNA flanqueante 3' *ldh* (que tiene también ~1100 pb) es idéntica al DNA cromosómico que codifica la otra mitad del gen *ldh* y parte de la región 5' no traducida del gen *adhI*. Ocurre un evento de doble entrecruzamiento cuando los fragmentos de DNA flanqueantes 5' y 3' *ldh* interaccionan ambos con sus homólogos cromosómicos y sufren recombinación homóloga. Este fenómeno, que es esencialmente irreversible y está mediado totalmente por la maquinaria enzimática del hospedador, desactiva el gen *ldh* cromosómico por inserción de la casete Spec^r que está flanqueada por dos sitios loxP de tipo salvaje en el centro del marco de lectura abierto. Dado que el constructo suicida no puede replicarse en *Z. mobilis*, la única forma de generar colonias estables resistentes a espectinomicina con pLDHSp-9WW (aparte de los mutantes espontáneos resistentes al fármaco que ocurren con una frecuencia muy baja) es un evento de doble entrecruzamiento por recombinación homóloga.

Construcción de pHimA

Para generar un constructo de silenciación para el gen *himA*, el DNA flanqueante de *ldh* en pLDHSp-9WW se reemplazó con DNA flanqueante de *himA* para direccionar el marcador seleccionable y el evento de doble entrecruzamiento al gen cromosómico *himA*. Para esta manipulación fueron precisos cuatro fragmentos de DNA que se describen a continuación.

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

El Fragmento 2 se derivaba también de pLDHSp-9WW. El plásmido se sometió a doble digestión con *FseI* y *AsiSI*, y el fragmento de DNA de 1005 pb *FseI*-*AsiSI* resultante se purificó por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% y el Kit de Recuperación de DNA Zymoclean Gel (catálogo #D4001, Zymo Research) para purificar el fragmento.
15 Este fragmento, designado Fragmento 2, contiene la casete *Spec^r* que está flanqueada por dos sitios *loxP* de tipo salvaje, uno en cada extremo.

El Fragmento 3 contiene DNA flanqueante 3' *himA*. El Fragmento 3 de ~1,12 Kpb se generó por PCR utilizando los Cebadores A y B. El molde para la amplificación PCR era DNA genómico que se aisló de ZW658 (ATCC #PTA7858) utilizando el Kit de Purificación de DNA Genómico Wizard (catálogo #A1125, Promega).

Cebador A (SEQ ID NO:14):

CTACTCATcctgcaggTTTAATGAATGAGCGGATGCTG

Cebador B (SEQ ID NO:15):

20 **CATCTTACTgcgatcgcTGACTTTCCGTGCCAGCCAG**

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

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

Cebador C (SEQ ID NO:16):

TCACTCATggccggccGGGATATCAGCTTGCATGCTC

Cebador D (SEQ ID NO:17):

35 **CATCTTACTggcgcgccGATATGCTGCCTTCCGAAGTG**

Las bases subrayadas del Cebador C (cebador directo) se hibridan a los nucleótidos 1138510-1138530 del genoma de *Z. mobilis* en el extremo 5' del marco de lectura abierto de *himA*, mientras que las minúsculas corresponden a un sitio *FseI* que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas de Cebador D (silenciador inverso) se hibridan a los nucleótidos 1139668-1139648 del genoma de *Z. mobilis* aguas arriba del gen *himA* del extremo 3' de un gen que codifica supuestamente un regulador de respuesta de dos componentes (Seo et al., Nat. Biotechnol. 23 (1), 63-68 (2005)), mientras que las minúsculas corresponden a un sitio *AstI* que se añadió al extremo 5' del cebador. Los sitios cromosómicos de fijación para los Cebadores C y D el producto PCR que se genera (Fragmento 4) se muestran en la Figura 10A. El producto PCR se digirió con *FseI* y *AscI*, y el fragmento resultante de 1159 pb se purificó por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%.
40

Los cuatro fragmentos de DNA arriba descritos se sometieron luego a una reacción de ligación de cuatro vías para ensamblar el constructo de silenciación *himA*, pHimA representado en la Figura 10B. La ratio molar de los Fragmentos 1-4 que se utilizó para esta reacción era aproximadamente 1:1:1:1. Una parte alícuota de la mixtura de la reacción de ligación se sometió a electroporación en *E. coli* DH10B y las células transformadas se extendieron en
45

placas sobre medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y espectinomycinina (100 µg/ml); las placas se incubaron a 37°C. Los transformantes de doble resistencia a ampicilina y espectinomycinina que contenían plásmidos con los insertos de tamaño correcto se identificaron inicialmente por PCR de colonias utilizando dos pares de cebadores diferentes: Cebador A/Cebador B, e Cebador C/Cebador D. La confirmación subsiguiente de clones positivos se obtuvo por análisis mediante digestión de restricción del DNA plasmídico con SbfI y AsclI, y análisis de la secuencia de DNA del DNA plasmídico pHimA de los clones PCR positivos. Para obtener el DNA plasmídico no metilado necesario para transformación de *Z. mobilis*, se introdujo pHimA en *E. coli* SCS110 (dcm⁻, dam⁻), y las células transformadas se extendieron en placas sobre medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y espectinomycinina (100 µg/ml); el crecimiento se realizó a 37°C. Las células químicamente competentes que se utilizaron para esta manipulación se obtuvieron de Stratagene (Cat. No. 200.247) y se siguió el protocolo del vendedor. Es importante observar que el uso de DNA plasmídico no metilado para transformación de las cepas de *Z. mobilis* que se derivan de ZM4 es crítico para el éxito, dado que el DNA plasmídico metilado que se aísla de las cepas de *E. coli* de tipo salvaje, como DH10B, es destruido fácilmente por el sistema de restricción/modificación del hospedador. En el último paso, el DNA plasmídico se aisló de uno de los transformantes SCS110 utilizando el Kit Plasmid Maxi de QIAGEN (Cat. No. 12162), y la concentración final de DNA era ~2 µg/µl.

Ejemplo 6

Generación del mutante de silenciación *himA* de ZW801-4

Para desactivar el gen *himA* en ZW801-4, se introdujo el DNA plasmídico no metilado pHimA (que no se replica en *Z. mobilis*) en ZW801-4 utilizando electroporación, esencialmente como se describe en US 5.514.583. Resumidamente, las reacciones de transformación de 50 µl contenían ~10¹⁰ células/ml en glicerol al 10% (v/v) y ~0,5 µg de DNA plasmídico no metilado que se aisló de *E. coli* SSC110 como se describe en el Ejemplo 5. La reacción de control se trató idénticamente, pero no recibió cantidad alguna de DNA plasmídico. Los ajustes para el electroporador eran 1,6 kV/cm, 200 Ω y 25 µF, y la anchura de la cubeta era 0,1 cm. Después de la electroporación, las reacciones de transformación se diluyeron con 1,0 ml de medio MMG (50 g/l glucosa, 10 g/l extracto de levadura, 5 g/l triptona, 2,5 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/l K₂HPO₄, y MgSO₄ 1 mM) y se dejó que se recuperaran las células durante ~3 horas a 30°C. Las células se recogieron luego por centrifugación a la temperatura ambiente (13.000 x g, 5 min) en tubos de microcentrífuga estériles de 1,5 ml y el sobrenadante se separó cuidadosamente. Los sedimentos de células se resuspendieron en 200 µl de medio MMG líquido, y partes alícuotas de 25, 50 y 100 µl de la suspensión de células se extendieron en placas sobre medio MMG que contenía 1,5% de agar y 200 µg/ml de espectinomycinina. Las placas se incubaron en una cámara anaerobia a 30°C, y después de 48-72 horas había al menos 100 colonias en la totalidad de las placas experimentales. En contraste, la reacción de control proporcionaba sólo una colonia que se encontraba en la placa que recibió 100 µl de la suspensión de células. Dos de las colonias resistentes a espectinomycinina que resultaron de la transformación con el constructo de silenciación pHimA se seleccionaron para manipulación ulterior como se describe a continuación.

Experimentos previos en el laboratorio de los inventores con *Z. mobilis* y constructos suicidas que son análogos a pHimA han revelado que la interacción inicial entre el cromosoma y el DNA plasmídico es un evento de entrecruzamiento simple que tiene lugar en una de las dos secuencias de DNA flanqueantes, y que los eventos de entrecruzamiento simple dan lugar finalmente a eventos de entrecruzamiento doble. La transición al evento de entrecruzamiento doble es normalmente muy rápida y ocurre usualmente después de un pequeño número de transferencias en serie en medio líquido o sólido que contiene el agente selectivo para el constructo suicida, en este caso espectinomycinina. Para facilitar el evento de entrecruzamiento doble para la presente invención y descartar la posibilidad de obtener una "población mixta" de eventos de entrecruzamiento simple y doble, los dos transformantes primarios descritos anteriormente se parchearon en una placa MMG que contenía 200 µg/ml de espectinomycinina. Después de un periodo de incubación de 30 horas a 33°C en condiciones anaerobias, se aislaron colonias simples de ambos parches por aplicación en bandas de las células sobre placas de agar nuevas que contenían el mismo medio de crecimiento. Después de un periodo de incubación de 30 horas a 33°C en condiciones anaerobias, una colonia de cada uno de los transformantes primarios originales se parcheó sobre una placa MMG reciente que contenía espectinomycinina (200 µg/ml), y estas dos cepas se caracterizaron ulteriormente como se describe a continuación.

La confirmación de que el evento de entrecruzamiento doble ocurría realmente y que cada cepa que se aisló estaba constituida por una porción homogénea de células se obtuvo por experimentos PCR de colonias utilizando tres pares de cebadores diferentes. El primer par de cebadores GTTCTGCGCCTGTTATTCTG (SEQ ID NO: 18) y CTACCTCTGATAGTTGAGTTCG (SEQ ID NO: 19) podrían generar sólo un producto PCR del tamaño correcto si el DNA flanqueante 5' *himA* en el constructo suicida hubiera sufrido un evento de entrecruzamiento simple con su homólogo cromosómico. Análogamente, el segundo par de cebadores, GATATTCCAGTGCTGATCGAC (SEQ ID NO: 20) y CTACGTGAAAGGCGAGATCAC (SEQ ID NO: 21) podrían generar únicamente un producto PCR de tamaño correcto si el DNAS flanqueante 3' *himA* en el constructo suicida hubiera sufrido un evento de entrecruzamiento simple con su homólogo cromosómico. Finalmente, el tercer par de cebadores, GATCAGGTAGGTGTGCTCTA (SEQ ID NO: 22) y GCATCAGAGAGCATACTGCT (SEQ ID NO: 23), podrían generar sólo un producto PCR del tamaño correcto si hubiera ocurrido un evento de entrecruzamiento doble en el locus correcto. Este par de cebadores era capaz también de detectar cantidades traza de copias no interrumpidas del gen *himA* y/o eventos de entrecruzamiento simple si estuvieran presentes también como contaminantes. Dado

que los dos mutantes de silenciación de *himA* que se examinaron producían los resultados esperados con 3 conjuntos de cebadores diferentes y resultaban indistinguibles, se seleccionó sólo uno de ellos para caracterización ulterior. A esta cepa se hace referencia en lo sucesivo como "Z801-4:: Δ himA".

Ejemplo 7

5 La desactivación del gen *himA* es exclusivamente responsable del fenotipo AcR#3

Una comparación en paralelo de ZW801-4 y ZW801-4:: Δ himA en 100% MH utilizando biorreactores de pH controlado se muestra en Fig. 11. Los cultivos de siembra se dejaron crecer a 30°C en medio SM hasta una DO₆₀₀ de ~4,4 y los biorreactores se pusieron en marcha con 10% de inóculo. Los cultivos finales de 150 ml contenían 100% MH + 110 g/l glucosa y 90 g/l xilosa. El agitador se puso en marcha a 150 rpm, y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 33°C, respectivamente. En diversos momentos, se retiraron partes alícuotas de los biorreactores para análisis HPLC del caldo de fermentación utilizando el procedimiento que se describe en el Ejemplo 2. Obsérvese que éstas son exactamente las mismas condiciones experimentales que se utilizaron para los experimentos con AcR#3 y ZW801-4 que se muestran en la Figura 8 y la Tabla 2 (Ejemplo 4).

Los resultados dados en la Figura 11 muestran que ZW801-4:: Δ himA (Figura 11B) se comportaba mucho mejor que ZW801-4 (Figura 11A) en 100% MH. Al cabo de 48 horas, el mismo había utilizado la totalidad de la glucosa y la xilosa en el medio de crecimiento y generó ~90 g/l etanol. En contraste, la cepa parental, ZW801-4, no utilizaba la totalidad del azúcar y quedaban todavía ~17 g/l xilosa residual en el caldo de fermentación al final del experimento. El título final de etanol para ZW801-4 era también significativamente menor (81 g/l). Por tanto, la silenciación del gen *himA* daba como resultado aproximadamente un 10% de aumento en la producción de etanol en condiciones relevantes del proceso, lo que es virtualmente idéntico a los resultados que se obtuvieron con AcR#3 utilizando las mismas condiciones experimentales. Aunque estos resultados sugerían claramente que AcR#3 y ZW801-4:: Δ himA son cepas equivalentes, era importante testar su comportamiento en un experimento en paralelo. Para esta comparación se utilizó también 100% MH, pero las concentraciones iniciales de glucosa y xilosa se incrementaron ambas ~10%, dado que ambas cepas eran capaces de utilizar la totalidad del azúcar en los experimentos anteriores.

Los cultivos de siembra se dejaron crecer a 30°C en medio SM hasta una DO₆₀₀ de 4,5, y los biorreactores se pusieron en marcha con 10% de inóculo. Los cultivos finales de 150 ml contenían 100% MH más 118 g/l glucosa y 98 g/l se xilosa. El agitador se puso en marcha a 150 rpm, y el pH y la temperatura se mantuvieron a 5,8 y 33°C, respectivamente. En diversos momentos, se retiraron partes alícuotas de los biorreactores para análisis HPLC del caldo de fermentación utilizando el procedimiento que se describe en el Ejemplo 2. Los valores finales para glucosa, xilosa, acetato, etanol y producción de biomasa (DO₆₀₀) para ambas cepas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de punto final para glucosa, xilosa, etanol y acetato en fermentadores de pH controlado con las cepas ZW801-4:: Δ himA y AcR#3 cultivadas en Hidrolizado Simulado 100% con alto contenido de azúcar.

Cepa	Horas	DO ₆₀₀	Glucosa	Xilosa	Acetato	Etanol
ZW801-4:: Δ himA	0	0,48	118,2	98,4	10,0	3,9
ZW801-4:: Δ himA	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

Los resultados de este experimento demuestran que la desactivación del gen *himA* es únicamente responsable de la eficiencia mejorada de fermentación, dado que ZW801-4:: Δ himA y AcR#3 se comportaban ambos idénticamente en el sistema de test. Estas dos cepas eran también indistinguibles cuando se testaron respecto a resistencia a acetato (Figura 12) utilizando las mismas condiciones que se utilizaron 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 prolongado de enriquecimiento en mutantes al que se sometió esta cepa tenían poco o ningún efecto sobre el fenotipo *himA* deseable.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110>

<120> ZIMOMONAS CON PRODUCCIÓN DE ETANOL MEJORADA EN MEDIO QUE
CONTIENE AZÚCARES CONCENTRADOS Y ACETATO

<130> CL4039PCT

<160> 26

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 342

<212> DNA

<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 1

atgaataaac gctatgataa cgcacaaaac ggacagagca tgcaagctga tatcccaact	60
ttgaccocg cggatattac cgacatgctt taccatgaag taggtttgtc gcgggcagat	120
tccgccaaga tgatcgaaca aatgcttggc cacattacag atgccctgaa aaaaggtgaa	180
aatgtcaaaa tatctggttt tggcagcttt attctcaggg ataaaaatga acgtggtggc	240
cgtaatccta aaacagggat cgaggctcct atcgcaccaa ggccgggttct gactttccgt	300
gccagccagt tgatgcgcoa gccgattatc aaggagcct aa	342

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

gtgaaaggcg agatcaccaa ggtagtc	27
-------------------------------	----

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 3

ctacctctga tagttgagtc gatacttcgg	30
----------------------------------	----

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 4
 ctactcattt cctgcagggtg gtaactcatt gcgcgctc 38

<210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> CATCTTACTggcgcgccAAAAATCTGCGGCTGACATAC

<400> 5
 catcttactg gcgcgccaaa aatctgcggc tgacatac 38

<210> 6
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 6
 actcatttcc atggcgatcg cactatgcgg ccgcaatgta gcacctgaag tcagcc 56

<210> 7
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 7
 atctcactcc atggccggcc aactattaat taagaattga ttggctccaa ttcttg 56

<210> 8
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> oligo sintético

<400> 8
 cgcataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatgc 39

<210> 9
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>

<223> oligo sintético

<400> 9

ggccgcataa cttcgtatag catacattat acgaagttat gcgat

45

<210> 10

<211> 43

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> oligo sintético

<400> 10

taaataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatggc cgg

43

<210> 11

<211> 41

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> oligo sintético

<400> 11

ccataacttc gtatagcata cattatacga agttatttaa t

41

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 12

ataaaaagcgg ccgcagcaca ggatga

26

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 13

ggcgtaatt aaggcaggtc agcaag

26

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 14
 ctactcatcc tgcaggttta atgaatgagc ggatgctg 38

<210> 15
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 15
 catcttactg cgatcgetga cttccgtgc cagccag 37

<210> 16
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 16
 tcaactcatgg ccggccggga taccagcttg catgctc 37

<210> 17
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 17
 catcttactg gcgcgccgat atgtgcctt ccgaagtg 38

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 18
 gttctgcgcc tggtattctg 20

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 19
ctacctctga tagttgagtc g 21

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 20
gatattccag tgctgatcga c 21

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 21
ctacgtgaaa ggcgagatca c 21

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 22
gatcaggtag gtgtgctcta 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 23
gcatcagaga gcatactgct 20

<210> 24
<211> 1302
<212> DNA
<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 24
atgacgaaca aaatctcgtc ttcagataat ctttccaatg ctgtttcagc aacggatgac 60
aacgcttccc gtacgccaaa tctgaccogt cgcgctctcg ttggtggtgg tgttgactg 120

ES 2 385 857 T3

gccgcagctg ggcgccttagc cagtggctct caggcagcga cgcttcctgc tggtgccagc 180
caggttccga ccacgcctgc aggtcgcccc atgccttaag cgatccgccc gatgccggaa 240
gatcgtcgtt tcggttatgc taccgtcggc ctgggtaaat atgcccttaa ccagatttta 300
ccgggttttg ccggatgcca gcattcccgc atcgaagctt tggtcagcgg taacgctgaa 360
aaagctaaaa tcgttgccgc 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 cactatgac caatgaaccg tgcagcggta 660
aaattgatcc gtgaaaacca gttgggtaaa ctgggcatgg ttaccaccga caactcagac 720
gttatggatc agaacgatcc tgcacagcag tggcgtctgc gtcgtgaact cgcgggtggc 780
ggttctttga tggatatcgg tatttatggc ttgaacggta cccgttactt gctgggtgaa 840
gaaccgatcg aagtcctgtc ttacacctac agcgatccga atgatgaacg tttcgttgaa 900
gtcgaagatc gtattatttg gcagatgcgc ttcagaagcg gtgctctgtc tcatggtgca 960
tcttcttatt cgaccacgac gacttcacgt ttctcgggtgc agggcgaaa agctgttctg 1020
ttgatggatc cggtaccgg atattatcag aatttgattt ctgtccagac cccaggccat 1080
gctaaccagt cgatgatgcc acagttcacc atgccagcga acaaccagt ctctgcacag 1140
ttggatcacc tggctgaagc cgtcatcaat aacaaaccag ttcgtagccc ggggtgaagaa 1200
ggtatgcagg atgtgcgctt gattcaggcc atttatgaag cagctcgtac cggtcgcccc 1260
gtcaacacgg attgggggta tgtccgtcag ggtgggttatt ga 1302

<210> 25

<211> 1287

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región codificante de GFOR con inserción y delección

<400> 25

atgacgaaca aaatctcgtc ttcagataat ctttccaatg ctgtttcagc aacggatgac 60

aacgcttecc gtaocccaaa tctgaccctg cgcgctctcg ttgggtgggg tgttggactg 120

gccgcagctg ggcgccttagc cagtggctct caggcagcga cgcttcctgc tggtgccagc 180

caggttccga ccacgcctgc aggtcgcccc atgccttaag cgatccgccc gatgccggaa 240

gatcgtcgtt tcggttatgc taccgtcggc ctgggtaaat atgcccttaa ccagatttta 300

ES 2 385 857 T3

ccgggttttg ccggatgcc a gcattccgc atcgaagctt tggtcagcgg taacgctgaa 360
 aaagctaaaa tcgttgccgc tgaatatggc gtcgatcccc gtaaaattta tgattacagc 420
 aacttcgaca agatcgctaa agatccaaaa atcgaagctg ttacatcat tttgccaaac 480
 tctttgcatg ctgaatttgc tatecgtgct ttcaaagcog gcaagcatgt tatgtgtgaa 540
 aagccgatgg caacctctgt tgctgattgt cagcggatga tcgatgcagc caaggctgct 600
 aataaaaagc tgatgatcgg ttaccgttgc cactatgatc caatgcaccg tgcagcgcac 660
 gcataacttc gtataatgta tgctatacga agttatggta ctcatggccg gcctcagaac 720
 gatcctgcac agcagtgccg tctgcgtcgt gaactcgccg gtggcgggtc tttgatggat 780
 atcggatatt atggctttaa cggtaaccgt tacttgctgg gtgaagaacc gatcgaagtc 840
 cgtgcttaca cctacagcga tccgaatgat gaacgtttcg ttgaagtcga agatcgtatt 900
 atttggcaga tgcgcttcag aagcgggtgct ctgtctcatg gtgcattctc ttattcgacc 960
 acgacgactt cacgtttctc ggtgcagggc gacaaagctg ttctgttgat ggatccggct 1020
 accggatatt atcagaattt gatttctgct cagacccag gccatgctaa ccagtcgatg 1080
 atgccacagt tcatcatgcc agcgaacaac cagttctctg cacagttgga tcatctggct 1140
 gaagccgtoa tcaataacaa accagttcgt agcccgggtg aagaaggtat gcaggatgtg 1200
 cgctgatc aggccattta tgaagcagct cgtaccggtc gccccgtaa cacggattgg 1260
 ggttatgtcc gtcaggggtg ttattga 1287

<210> 26
 <211> 113
 <212> PRT
 <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

ES 2 385 857 T3

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

- 5 1. Un microorganismo recombinante del género *Zymomonas* capaz de utilizar xilosa para producir etanol por fermentación en un medio de azúcares mixtos, comprendiendo dicho microorganismo al menos una modificación genética en el gen *himA*, que reduce la expresión de la proteína de la subunidad alfa del factor endógeno de integración del hospedador (HimA) codificada por un gen *himA*.
2. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el cual la modificación genética es una modificación del gen *himA* seleccionada del grupo constituido por inserción, delección, mutación, cosupresión, y expresión de RNA antisentido.
3. El microorganismo recombinante de la reivindicación 2, en el cual el gen *himA* se ha hecho no funcional.
- 10 4. El microorganismo recombinante de la reivindicación 3, en el cual se introduce una inserción en el gen *himA* por recombinación homóloga.
5. El microorganismo de la reivindicación 1, que comprende genes heterólogos que codifican xilosa-isomerasa, xiluloquinasa, transaldolasa y transcetolasa.
- 15 6. Un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual los genes heterólogos que codifican xilosa-isomerasa, xiluloquinasa, transaldolasa y transcetolasa son de bacterias seleccionadas del grupo constituido por *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhodobacter*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Salmonella* y *Pseudomonads*.
7. Un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual los genes heterólogos son de *E. coli*.
- 20 8. El microorganismo de la reivindicación 1, en el cual el microorganismo tiene eficiencia de fermentación mejorada en presencia de acetato en comparación con un microorganismo sin modificación genética alguna que reduce la expresión de la proteína de la subunidad alfa del factor endógeno de integración del hospedador (HimA).
9. El microorganismo de la reivindicación 8, en el cual el microorganismo produce al menos aproximadamente 4% más etanol en presencia de acetato que una cepa isogénica sin expresión reducida de la proteína de la subunidad alfa del factor endógeno de integración del hospedador (HimA).
- 25 10. Un proceso para generar el microorganismo de la reivindicación 1 que comprende:
 - a) proporcionar una cepa recombinante de *Zymomonas* capaz de utilizar xilosa para producir etanol en condiciones adecuadas en las cuales el genoma de dicha cepa expresa la proteína de la subunidad alfa del factor endógeno de integración del hospedador (HimA); y
 - 30 b) modificar el genoma de dicha cepa en la cual dicha modificación reduce la expresión de la proteína de la subunidad alfa del factor endógeno de integración del hospedador (HimA).
11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la cepa recombinante de *Zymomonas* de (a) es ZW658, depositada bajo el número de acceso ATCC PTA 7858.
- 35 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la modificación genética es una modificación del gen *himA* seleccionada del grupo constituido por inserción, delección, mutación, cosupresión, y expresión de RNA antisentido.

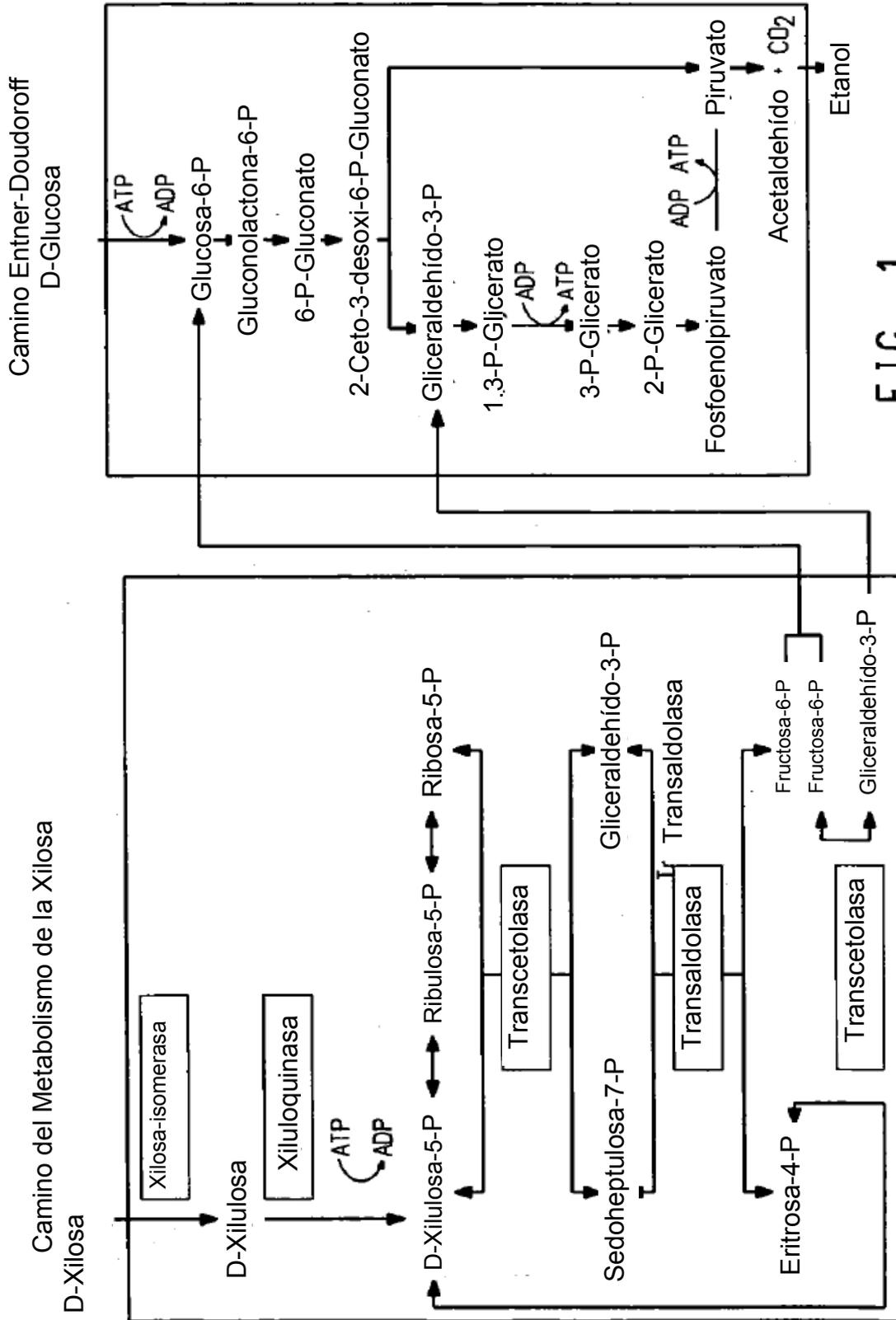


FIG. 1

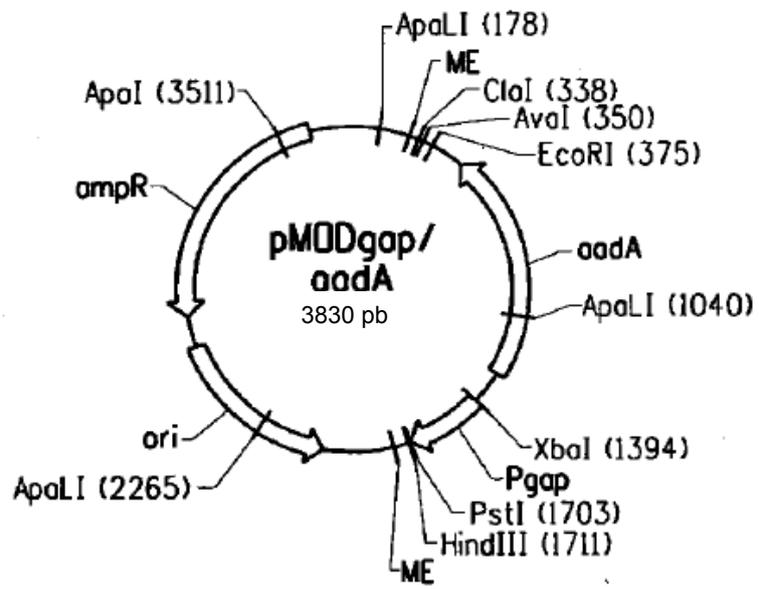


FIG. 2

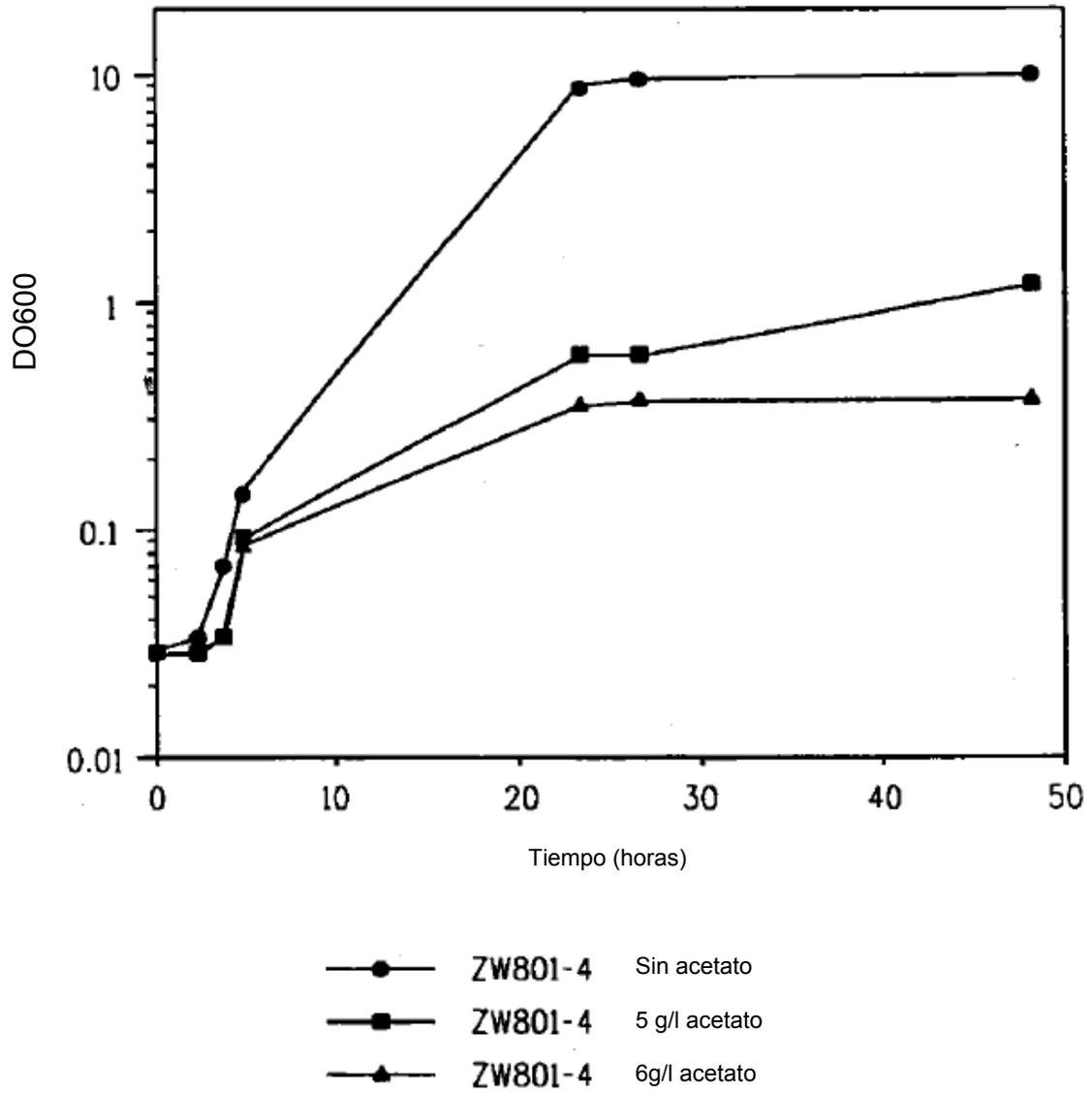


FIG. 3

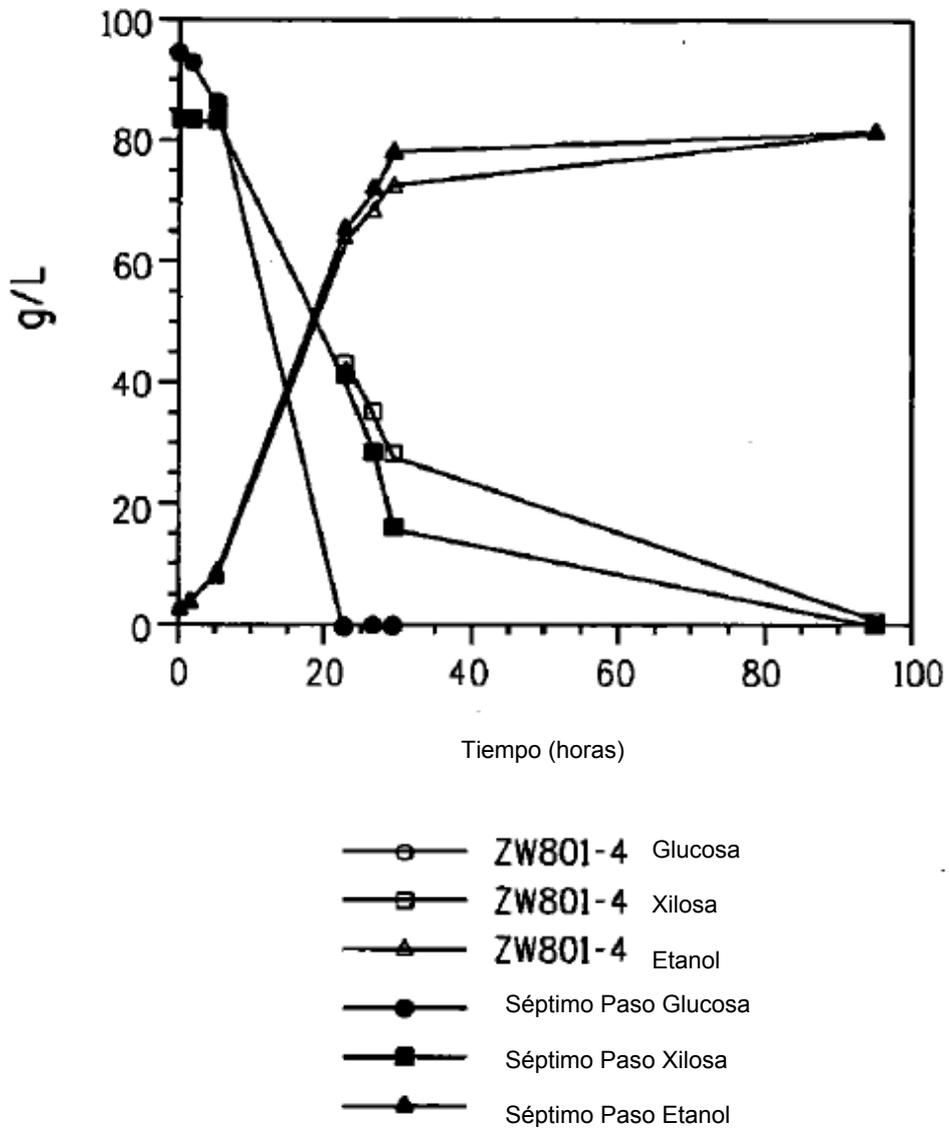
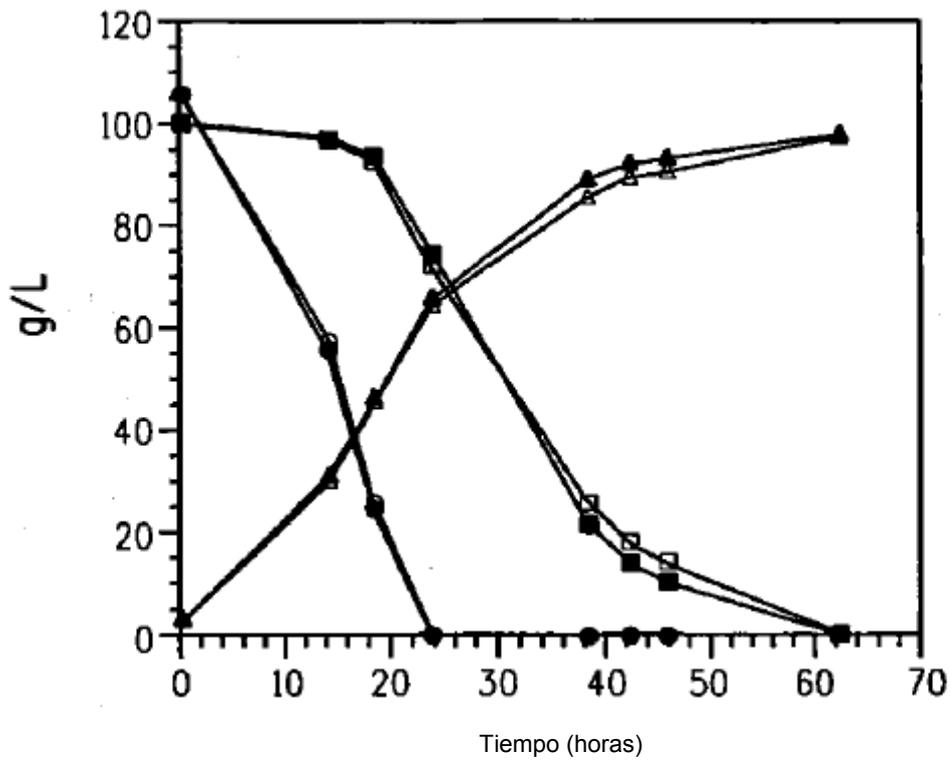


FIG. 4A



- ZW801-4 Glucosa
- ZW801-4 Xilosa
- △— ZW801-4 Etanol
- Séptimo Paso Glucosa
- Séptimo Paso Xilosa
- ▲— Séptimo Paso Etanol

FIG. 4B

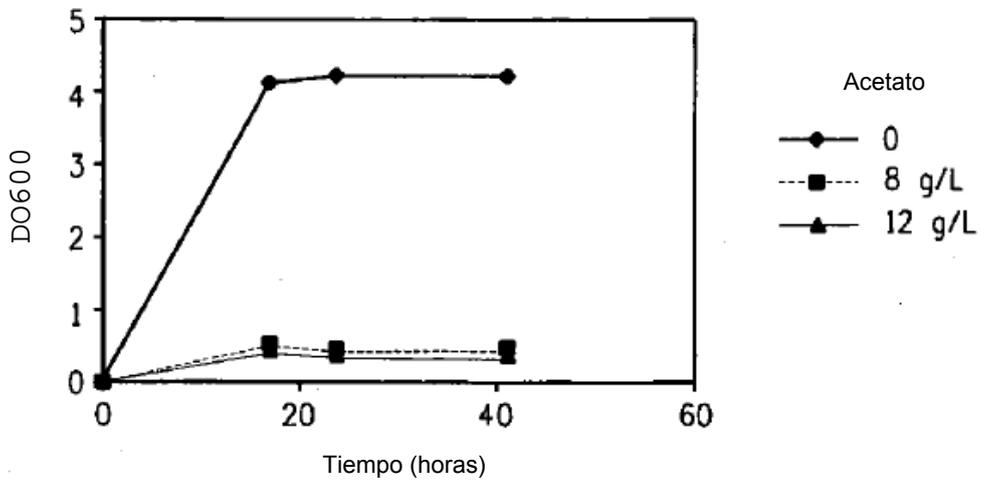


FIG. 5A

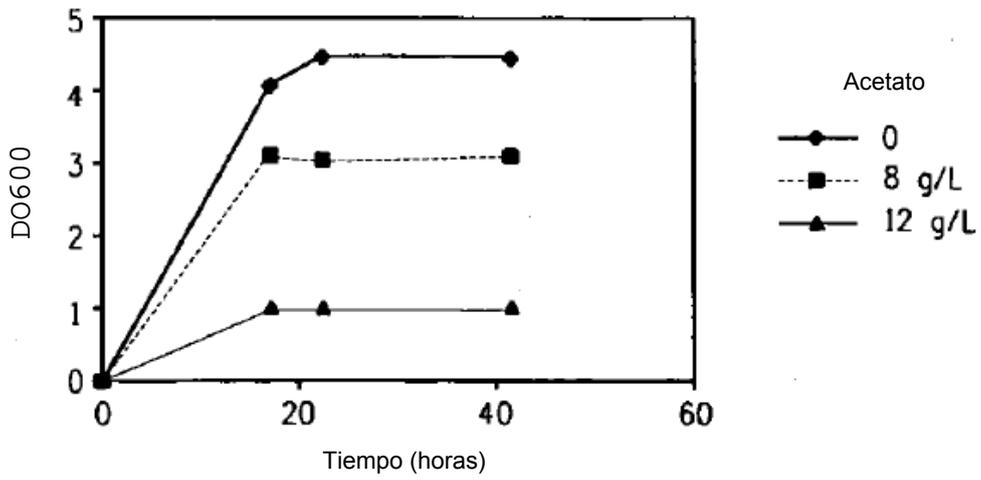


FIG. 5B

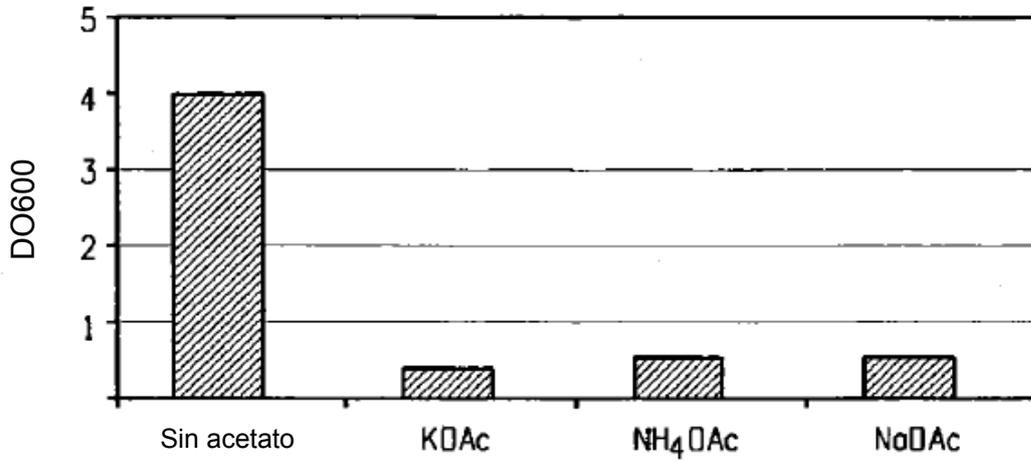


FIG. 6A

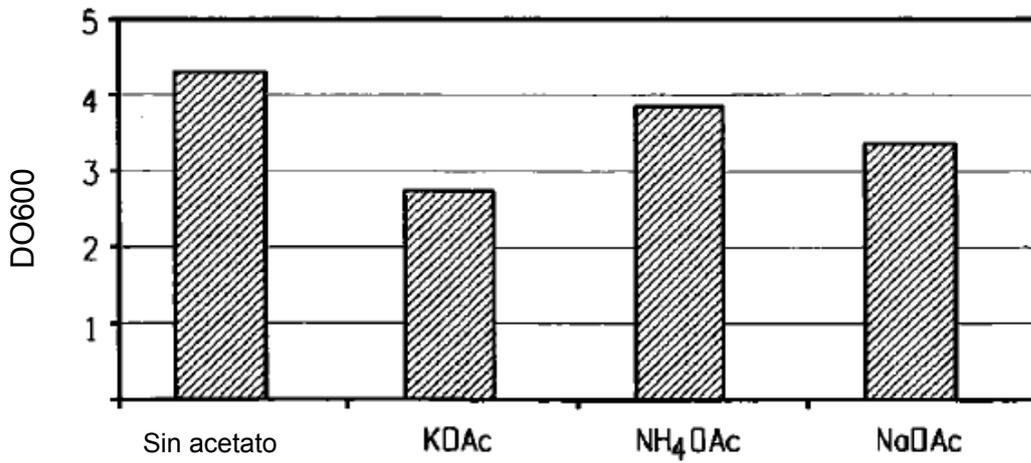
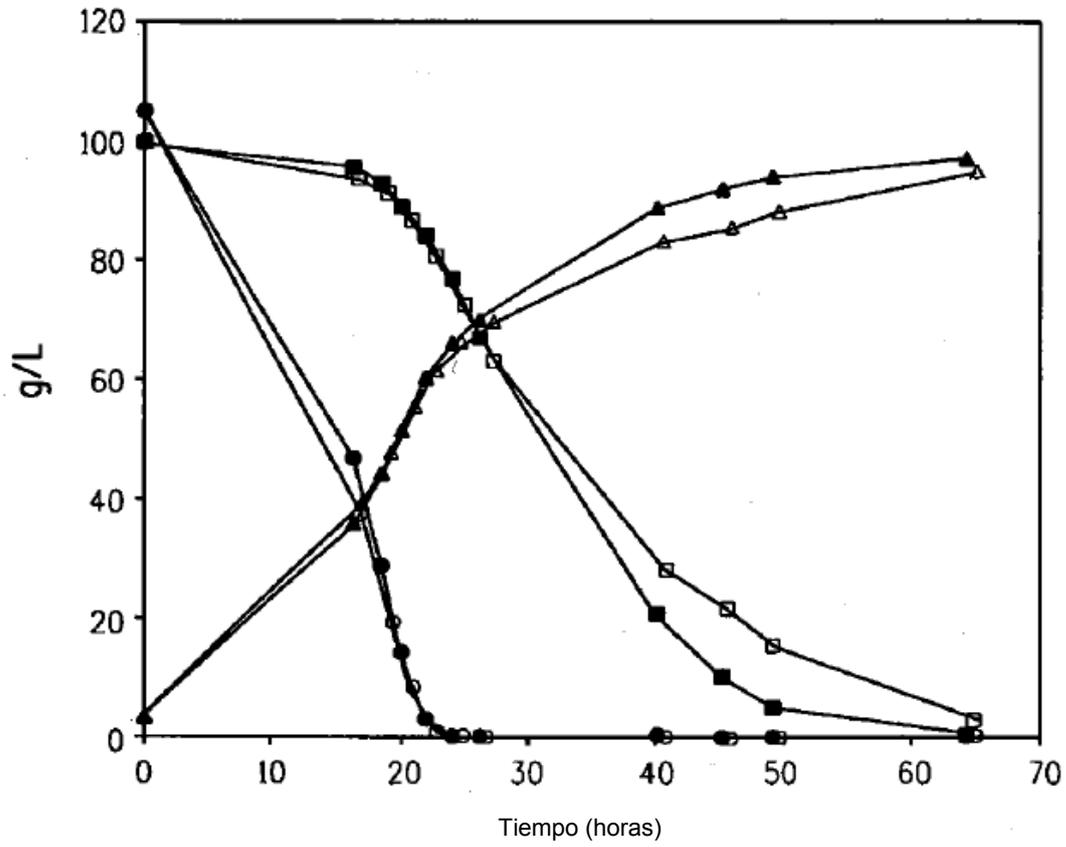


FIG. 6B



- ZW801-4 Glucosa
- ZW801-4 Xilosa
- △— ZW801-4 Etanol
- AcR*3 Glucosa
- AcR*3 Xilosa
- ▲— AcR*3 Etanol

FIG. 7

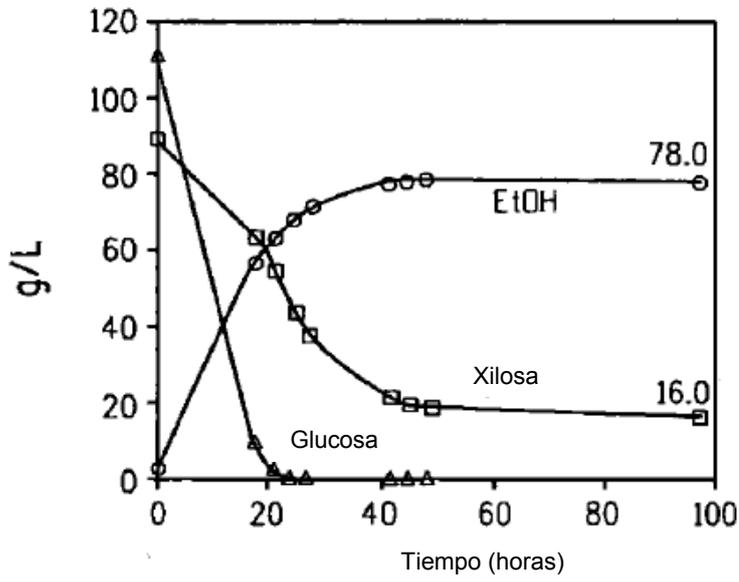


FIG. 8A

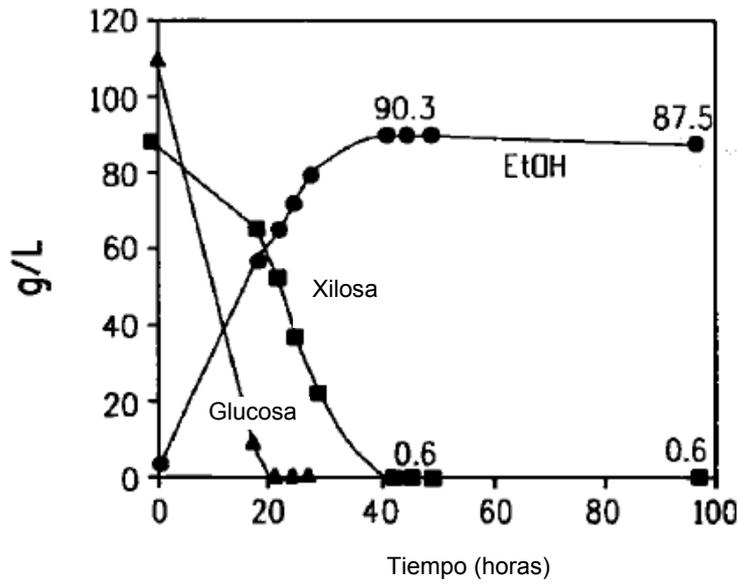


FIG. 8B

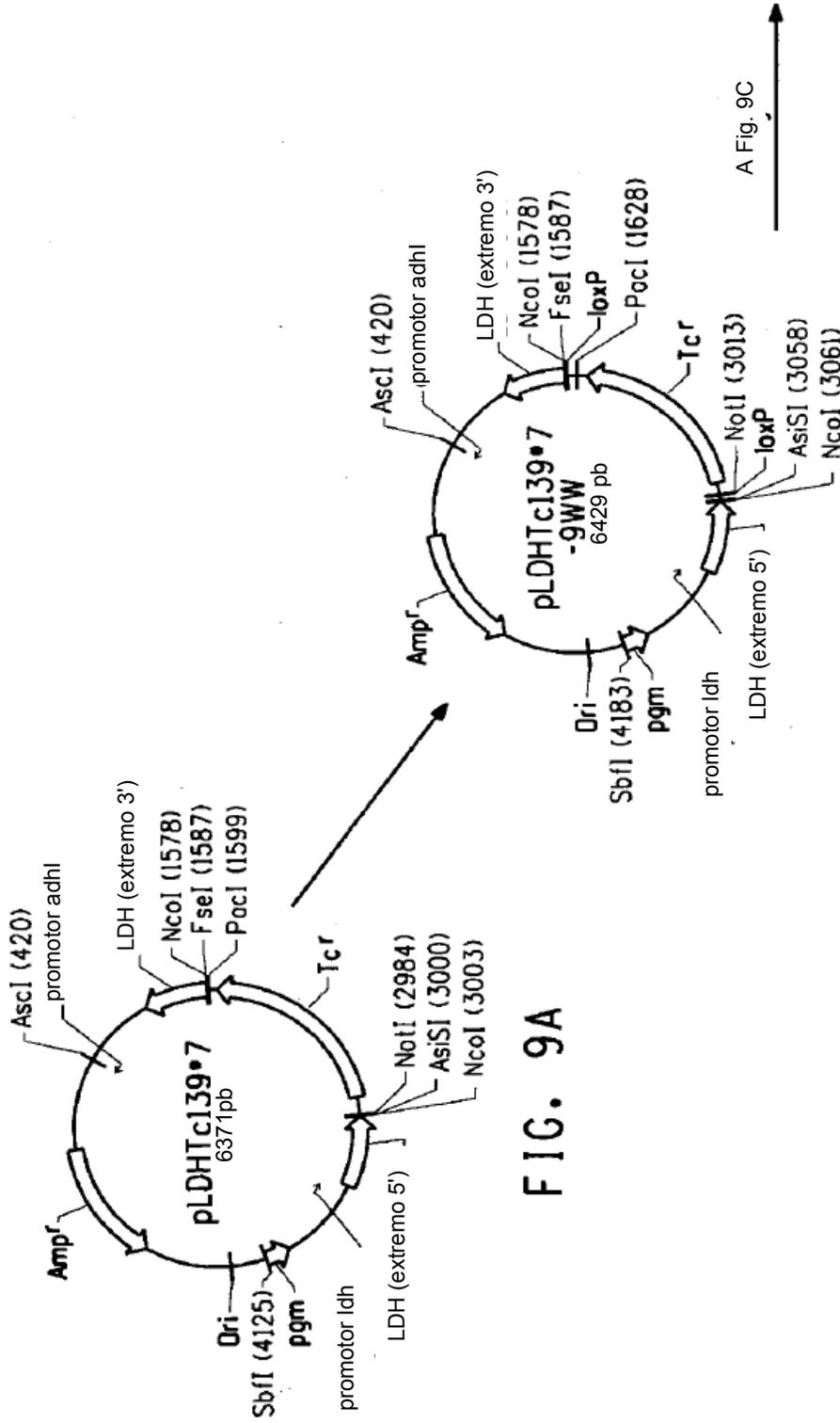


FIG. 9B

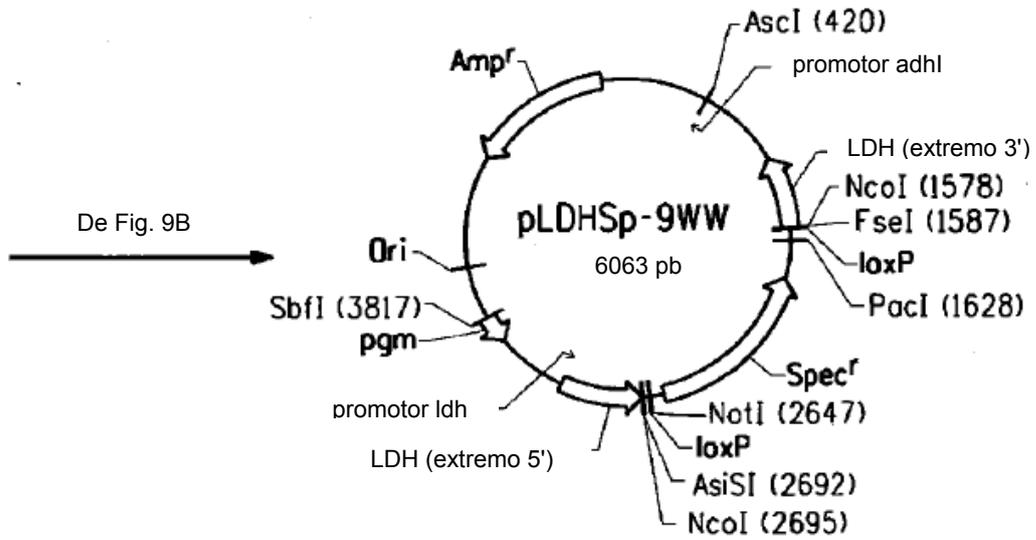


FIG. 9C

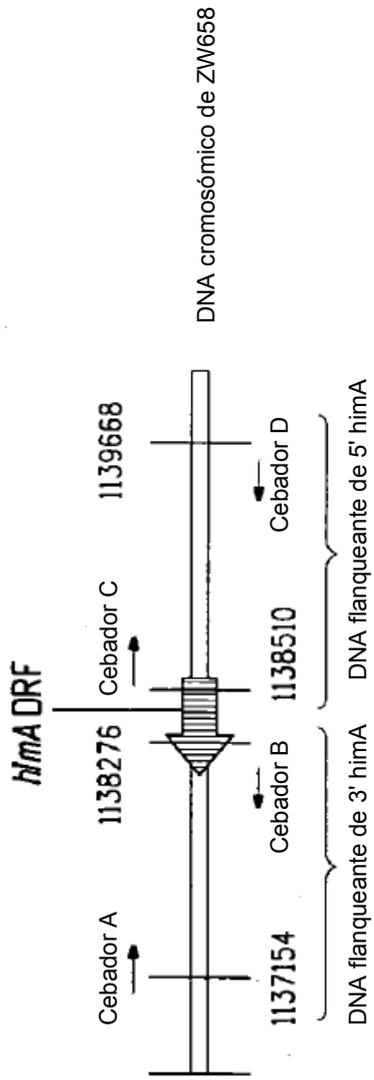


FIG. 10A

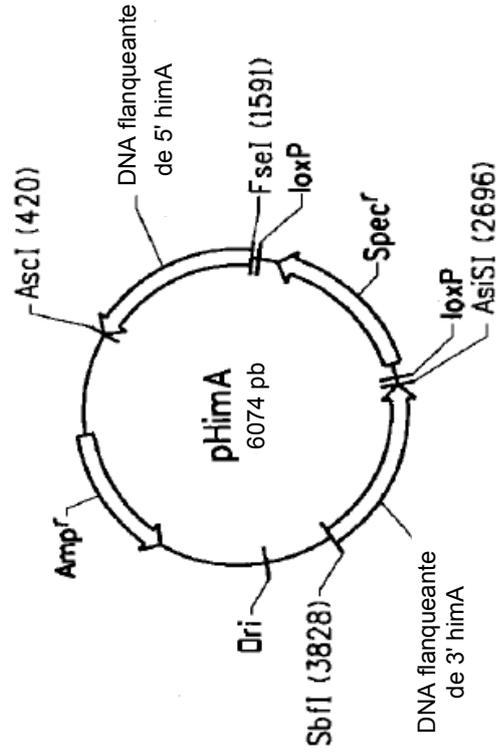


FIG. 10B

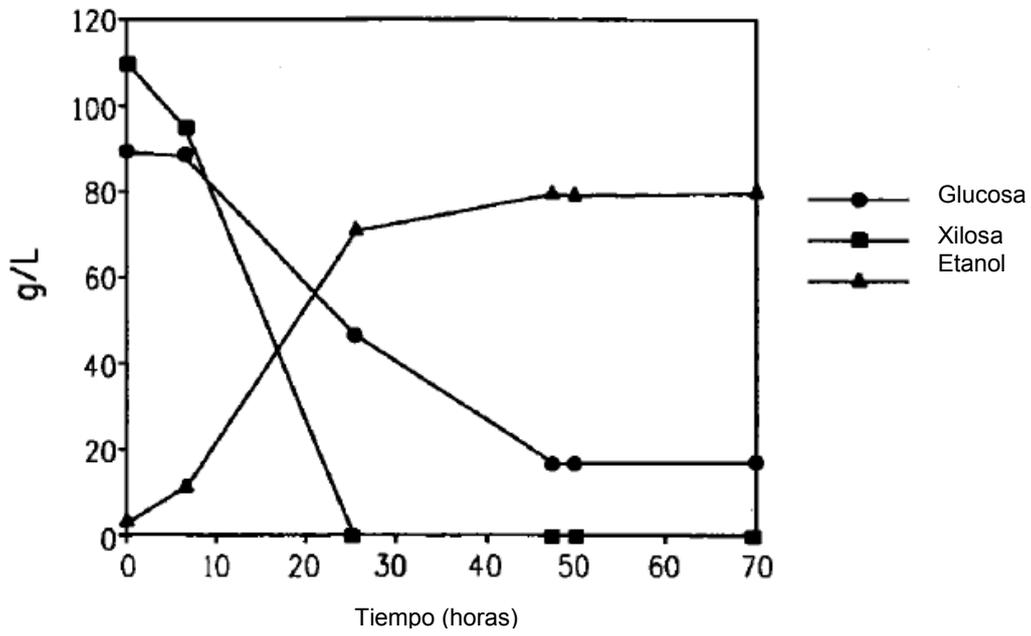


FIG. 11A

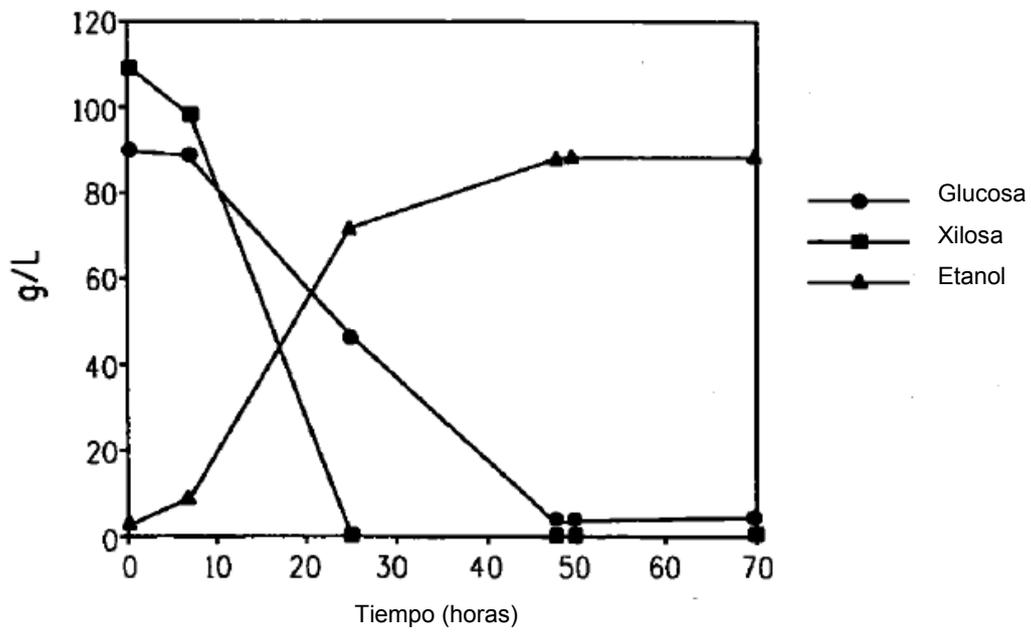


FIG. 11B

FIG. 12A

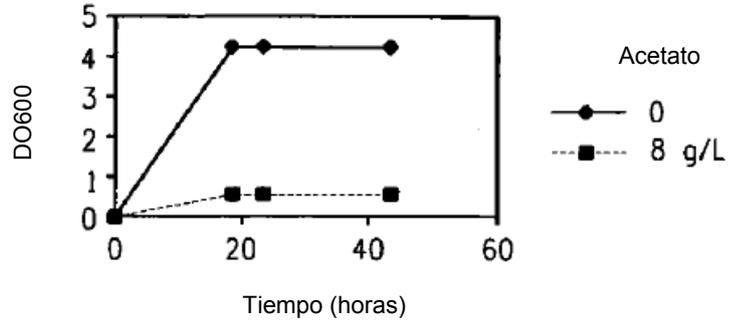


FIG. 12B

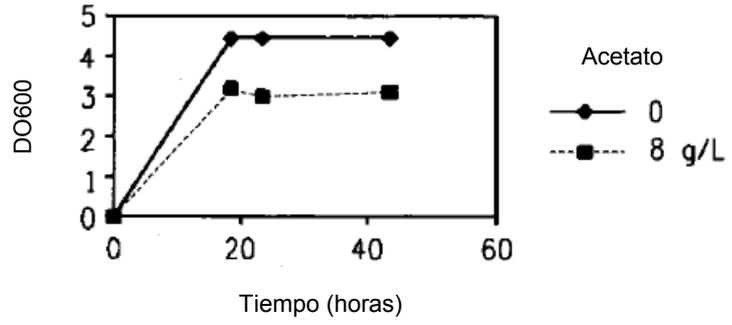


FIG. 12C

