

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 644**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12P 7/28 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)
C12P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2007 E 07722619 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2035543**

54 Título: **Cepa BG1 de Thermoanaerobacter mathranii**

30 Prioridad:

22.05.2006 DK 200600703

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

27.11.2013

73 Titular/es:

**BIOGASOL IPR APS (100.0%)
Lautrupvang 2A
2750 Ballerup, DK**

72 Inventor/es:

**MIKKELSEN, MARIE JUST;
AHRING, BIRGITTE KIÆR y
GEORGIEVA, TANIA IVANOVA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 431 644 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepa BG1 de *Thermoanaerobacter mathranii*

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una nueva bacteria termófila que pertenece al grupo de *Thermoanaerobacter mathranii*.

Antecedentes de la invención

10 La industria de producción de productos de fermentación, tal como el etanol y ácido láctico, está enfrentándose al desafío de redirigir el procedimiento de producción desde la fermentación de materiales almidonados caros, pero de conversión relativamente fácil, hacia biomasas lignocelulósicas complejas, pero baratas, tales como madera y residuos de cultivos agrícolas, por ejemplo, paja. A diferencia del almidón, que contiene polímeros homogéneos y fácilmente hidrolizables, la biomasa lignocelulósica contiene celulosa (del 25-53%), hemicelulosa (del 20-35%), lignina polifenólica (del 10-25%) y otros componentes extraíbles. Generalmente, la primera etapa en la utilización de la biomasa lignocelulósica es una etapa de pretratamiento para fraccionar los componentes del material lignocelulósico y aumentar su superficie específica. El procedimiento de pretratamiento que se emplea más a menudo es la hidrólisis ácida, en la que el material lignocelulósico se somete a un ácido, tal como ácido sulfúrico, con lo cual los polímeros de azúcares de celulosa y hemicelulosa son parcial o completamente hidrolizados a sus constituyentes de monómeros de azúcar. Otro tipo de hidrólisis de la lignocelulosa es la explosión de vapor, un procedimiento que comprende calentar el material lignocelulósico mediante una inyección de vapor hasta una temperatura de 190-230 °C. Un tercer procedimiento es la oxidación en húmedo, en la que el material se trata con oxígeno a 150-185 °C. A los pretratamientos les puede seguir una hidrólisis enzimática para completar la liberación de los monómeros de azúcar. Esta etapa de pretratamiento da como resultado la hidrólisis de la celulosa en glucosa, mientras que la hemicelulosa se transforma en las pentosas xilosa y arabinosa y las hexosas glucosa, galactosa y manosa. Así, en contraste con el almidón, la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica da como resultado la liberación de azúcares de pentosa, además de azúcares de hexosa. Esto implica que los organismos fermentadores útiles deben ser capaces de convertir los azúcares de hexosa y pentosa en los productos de la fermentación deseados, tales como etanol.

15 Los microorganismos tradicionales utilizados, por ejemplo, para la fermentación del etanol, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*, no metabolizan las pentosas, tales como la xilosa y la arabinosa, y así es necesaria una modificación metabólica a gran escala para mejorar el rendimiento sobre sustratos lignocelulósicos. Las bacterias termófilas gram-positivas tienen ventajas exclusivas frente a las cepas de producción de etanol convencionales. Las principales ventajas son su amplia especificidad de sustrato y alta producción natural de etanol. Además, la fermentación del etanol a temperaturas elevadas (55-70 °C) tiene muchas ventajas frente a la fermentación mesófila. Una ventaja de la fermentación termófila es la minimización del problema de la contaminación en cultivos continuos, puesto que solo unos pocos microorganismos son capaces de crecer a temperaturas tan altas en un hidrolizado de lignocelulosa no desintoxicado.

20 En la actualidad, dependiendo del procedimiento de pretratamiento, a menudo hay que añadir celulasas y hemicelulasas al hidrolizado lignocelulósico pretratado para liberar los monómeros de azúcar. Estas enzimas contribuyen significativamente a los costes de producción de los productos de la fermentación. Sin embargo, muchas cepas gram-positivas termófilas poseen una gama de enzimas pertinentes, y las adiciones suplementarias serán menos caras si se emplea una cepa gram-positiva termófila. La fermentación a alta temperatura también tiene la ventaja de una alta productividad y conversión del sustrato, y facilita la recuperación del producto.

25 Los hidrolizados de lignocelulosa contienen inhibidores, tales como furfural, fenoles y ácidos carboxílicos, que pueden inhibir potencialmente al organismo fermentador. Por tanto, el organismo también debe ser tolerante a estos inhibidores. El efecto inhibitor de los hidrolizados puede reducirse aplicando un procedimiento de desintoxicación antes de la fermentación. Sin embargo, la inclusión de esta etapa adicional del procedimiento aumenta significativamente el coste total del producto de la fermentación y preferiblemente debe evitarse. Por ejemplo, se ha calculado que la alcalinización del hidrolizado de sauce aumenta el coste de la producción de etanol empleando *Escherichia coli* al 22 % (Von Sivers *et al.*, 1994). Por tanto, se prefiere que el microorganismo sea capaz de producir productos de la fermentación a partir de hidrolizados de holocelulosa o hemicelulosa no desintoxicados para que puedan utilizarse en un procedimiento de fermentación con base lignocelulósica industrial, debido al alto coste del procedimiento de desintoxicación.

30 También resulta particularmente ventajoso si el microorganismo potencial es capaz de crecer sobre altas concentraciones de hidrolizados lignocelulósicos, es decir, hidrolizados lignocelulósicos con un alto contenido en materia seca. Esto resulta particularmente importante cuando el microorganismo se emplea para la producción de alcoholes, tal como la producción de etanol, puesto que los costes de la destilación aumentan con concentraciones

decrecientes de alcohol.

La patente de EEUU 6.555.350 describe una cepa de *Thermoanaerobacter* que es capaz de convertir pentosas en etanol. Sin embargo, esta cepa tiene una producción secundaria significativa de lactato y solo ha sido ensayada en hidrolizados lignocelulósicos que tienen una concentración de materia seca menor que 6% en p/p.

5 Larsen *et al.*, 1997, describen una cepa A3 de *Thermoanaerobacter mathranii* que sólo puede crecer en hidrolizados de paja de trigo con una concentración de materia seca del 6% (60 g/l de peso seco de paja de trigo suplementada con xilosa) y se divulga que no es capaz de crecer sobre galactosa.

Carlier *et al.* (Anaerobe, 2006, 12:153-159) describe la nueva subespecie *Alimentarius* de *Thermoanaerobacter mathranii* que es capaz de crecer sobre galactosa.

10 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo que es capaz de solucionar los obstáculos mencionados anteriormente, en particular para la producción de etanol.

Sumario de la invención

15 Por consiguiente, la presente invención proporciona una cepa bacteriana de *Thermoanaerobacter mathranii* seleccionada de BG1 (n.º de registro DSMZ 18280) y sus mutantes, siendo capaces dicha cepa y dichos mutantes de esta de crecer en un medio que comprende un material de biomasa lignocelulósica hidrolizada que tiene un contenido en materia seca de al menos 10% en p/p. Además, BG1 tiene una amplia especificidad de sustrato, y es capaz de utilizar pentosas, tales como xilosa y arabinosa, y hexosas. La cepa también tiene la ventaja de ser termófila y, así, es capaz de crecer a altas temperaturas, lo cual da como resultado altas productividades y velocidades de conversión del sustrato, bajo riesgo de contaminación, y se facilita la recuperación del producto.

20 La invención también proporciona un procedimiento para producir un producto de la fermentación mediante el cultivo de una cepa según la invención bajo condiciones adecuadas.

Descripción detallada de la invención

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a una cepa de *Thermoanaerobacter mathranii* seleccionada de BG1 y sus mutantes.

25 La cepa bacteriana aislada BG1 se ha depositado según los términos del Tratado de Budapest el 17 de mayo de 2006 en DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, con el n.º de registro DSMZ 18280.

30 Como resulta evidente a partir de lo siguiente, se han depositado las bacterias preferidas de la presente invención. Por tanto, otras bacterias de la presente invención pueden obtenerse mutando las bacterias depositadas y seleccionando los mutantes derivados que posean características mejoradas. Las características deseables incluyen una mayor gama de azúcares que puedan utilizarse, mayor velocidad de crecimiento, la capacidad de producir mayores cantidades de productos de la fermentación, tales como etanol, etc. Los procedimientos adecuados para mutar bacterias y seleccionar los mutantes deseados se describen en Functional analysis of Bacterial genes: A practical manual, editado por W. Schumann, S.D. Ehrlich & N. Ogasawara, 2001.

35 La cepa base BG1 es capaz de crecer y producir productos de la fermentación sobre hidrolizados lignocelulósicos con concentraciones muy altas de materia seca. En el presente contexto, la expresión "hidrolizado lignocelulósico" pretende indicar una biomasa lignocelulósica que se ha sometido a una etapa de pretratamiento por la cual el material lignocelulósico ha sido al menos parcialmente separado en celulosa, hemicelulosa y lignina, habiendo aumentado con ello la superficie específica del material. El material lignocelulósico puede derivarse generalmente
40 de un material vegetal, tal como paja, heno, residuos de jardinería, madera triturada, cáscaras de frutos y cáscaras de semillas.

45 El procedimiento de pretratamiento que se emplea más a menudo es la hidrólisis ácida, en la que el material lignocelulósico se somete a un ácido, tal como ácido sulfúrico, con lo cual los polímeros de azúcares de celulosa y hemicelulosa son parcial o completamente hidrolizados a sus constituyentes de monómeros de azúcar. Otro tipo de hidrólisis de lignocelulosa es la explosión de vapor, un procedimiento que comprende calentar el material lignocelulósico mediante una inyección de vapor hasta una temperatura de 190-230 °C. Un tercer procedimiento es la oxidación en húmedo, en la que el material se trata con oxígeno a 150-185 °C. A los pretratamientos les puede seguir una hidrólisis enzimática para completar la liberación de los monómeros de azúcar. Esta etapa de pretratamiento da como resultado la hidrólisis de la celulosa en glucosa, mientras que la hemicelulosa se
50 transforma en las pentosas xilosa y arabinosa y las hexosas glucosa, galactosa y manosa. La etapa de pretratamiento, en ciertas realizaciones, puede ser suplementada con un tratamiento que da como resultado una mayor hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa. El objetivo de este tratamiento de hidrólisis adicional es hidrolizar

5 las especies de oligosacáridos, y quizá de polisacáridos, producidas durante la hidrólisis ácida, la oxidación en húmedo o la explosión de vapor del origen de celulosa y/o hemicelulosa para formar azúcares fermentables (por ejemplo, glucosa, xilosa y quizá otros monosacáridos). Estos otros tratamientos pueden ser químicos o enzimáticos. La hidrólisis química se realiza generalmente mediante un tratamiento con un ácido, tal como un
5 tratamiento con ácido sulfúrico acuoso, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 100-150 °C. La hidrólisis enzimática se realiza generalmente mediante un tratamiento con una o más enzimas carbohidrasas apropiadas, tales como celulasas, glucosidasas y hemicelulasas, que incluyen xilanasas.

10 La cepa bacteriana según la invención es capaz de crecer en un medio que comprende un material de biomasa lignocelulósica hidrolizada que tiene un contenido en materia seca (o, tal como se también se emplea en la presente, "sólidos totales", TS) de al menos 10% en p/p, tal como al menos 15% en p/p, que incluye al menos 20% en p/p, e incluso tanto como 25% en p/p. Como se mencionó previamente, esto tiene la gran ventaja de que puede no ser necesario diluir el hidrolizado antes del procedimiento de fermentación, y por tanto es posible obtener
15 mayores concentraciones de productos de la fermentación, tales como etanol, y así pueden disminuir los costes de la posterior recuperación de los productos de la fermentación. Por ejemplo, los costes de la destilación para el etanol aumentarán con concentraciones decrecientes de alcohol.

20 La cepa bacteriana según la invención es una bacteria termófila anaerobia, y es capaz de crecer a altas temperaturas, incluso a 70 °C o más. El hecho de que la cepa sea capaz de actuar a esta temperatura alta es de mucha importancia para la conversión del material lignocelulósico en los productos de la fermentación. La velocidad de conversión de los carbohidratos, por ejemplo en etanol, es mucho más rápida cuando se realiza a altas temperaturas. Por ejemplo, la productividad del etanol en un *Bacillus* termófilo es hasta 10 veces más rápida que un procedimiento de fermentación de levaduras convencional que funciona a 30 °C. Por consiguiente, se requiere una planta de producción más pequeña para una productividad volumétrica dada, reduciendo con ello los
25 costes de construcción de la planta. Como también se ha mencionado previamente, a altas temperaturas hay menos riesgo de contaminación de otros microorganismos, lo cual da como resultado un menor tiempo muerto, una mayor productividad de la planta y menos necesidades energéticas para la esterilización del material procesable. La alta temperatura de funcionamiento también puede facilitar la posterior recuperación de los productos de la fermentación resultantes.

30 Numerosos productos de la fermentación son materias primas valiosas que se emplean en diversas áreas tecnológicas, que incluyen la industria alimentaria y la industria química. En la actualidad, las crecientes necesidades energéticas globales han dado como resultado una mayor atención a alternativas a los combustibles fósiles como fuente energética, y el etanol derivado de materiales vegetales (bioetanol) ha recibido particular atención como sustituto potencial o suplemento para los productos hidrocarbonados líquidos derivados del petróleo.

35 El ácido láctico, que es otro producto de la fermentación, se emplea ampliamente en la industria cosmética como producto químico antienvjecimiento, y la industria alimentaria emplea el ácido láctico en una diversidad de productos alimentarios para actuar como regulador de la acidez. En fechas recientes, el ácido láctico también ha atraído mucha atención por su uso potencial en políesteres biodegradables.

40 La cepa según la invención tiene el potencial de ser capaz de producir una serie de diferentes productos de la fermentación, que incluyen ácidos, alcoholes, cetonas e hidrógeno. En una realización, el alcohol se selecciona de etanol, butanol, propanol, metanol, propandiol y butandiol. En otra realización, el ácido es ácido láctico, propionato, acetato, succinato, butirato o formiato, y la cetona es acetona.

45 Como se mencionó anteriormente, BG1 es una cepa de tipo salvaje aislada a partir de un manantial de agua caliente islandés, y tiene varias características muy ventajosas necesarias para la conversión de material de biomasa lignocelulósica. Así, esta cepa base posee toda la maquinaria genética para la conversión de los azúcares pentosa y hexosa en diversos productos de la fermentación, tales como ácido láctico y etanol.

50 Como será evidente a partir de los siguientes ejemplos, el estudio de la secuencia de ARNr 16S completa (SEQ ID NO: 14) demuestra que la cepa BG1 está muy relacionada con la cepa A3 de *Thermoanaerobacter mathranii* (Larsen *et al.*, 1997). Esto coloca a BG1 en el agrupamiento V de los *Clostridium*. Aunque las cepas están muy relacionadas, son muy diferentes con respecto a la tolerancia a hidrolizados hemicelulósicos. A3 solo puede crecer en hasta 40% de hidrolizado de paja de trigo (de 60 g/l de peso seco de paja de trigo suplementada con xilosa, es decir, una concentración en materia seca del 6% en p/p), mientras que BG1 puede crecer y producir etanol a partir de un hidrolizado sin diluir a altas concentraciones de materia seca (hasta al menos 25%) sin la adición de azúcares o enzimas. Además, se ha divulgado que la cepa A3 no es capaz de crecer sobre galactosa (Larsen *et al.*, 1997), mientras que BG1 crece bien y produce principalmente etanol con la galactosa como única fuente de
55 carbono. Así, la cepa según la invención es capaz de crecer sobre galactosa como única fuente de carbono.

Como se muestra en los ejemplos adjuntos, en las primeras horas de crecimiento de BG1 a pH = 7 y 70 °C en medio mínimo de xilosa, se produce etanol y acetato en cantidades equimolares. Cuando el cultivo entra después en la fase exponencial tardía, la producción de etanol específica es mucho mayor que la del acetato. El pH después de la fermentación no cambia, y por tanto no se espera el efecto provocado por el pH. De modo similar, se demostró que la sustitución del espacio superior de N₂/CO₂ por hidrógeno puro, o la adición de acetato, no tiene efecto sobre la fermentación y, por tanto, los mecanismos que están detrás del desplazamiento hacia la formación de etanol en la fase exponencial tardía aún no están aclarados.

Los ejemplos también ilustran que el pH del medio tiene un fuerte efecto sobre el perfil del producto de BG1. Por encima de pH 6,5, la producción de etanol es dominante, y casi no se produce lactato. Por debajo de pH 6,0, la producción de lactato aumenta a expensas del etanol, y a pH 5,0 no se observa crecimiento. Se ha observado el mismo efecto del pH sobre la producción de lactato para la bacteria termófila muy relacionada *Thermoanaerobacter wiegelli*. Se ha descubierto que los extractos celulares brutos contenían una lactato deshidrogenasa (LDH) activada por fructosa-1,6-difosfato (FDP). La afinidad de FDP depende del pH extracelular. La activación máxima se observó a pH 6,2, y no se observó activación a pH 8,2 (Cook, 2000). Puesto que este efecto es común en las especies de *Thermoanaerobacter*, también es probable que sea la causa en BG1 (Lamed y Zeikus, 1980; Carreira *et al.*, 1982; Bryant, 1991).

Los siguientes ejemplos también ilustran el efecto de la adición de etanol sobre la velocidad de crecimiento y la distribución de metabolitos de BG1. La baja tolerancia al etanol es un importante obstáculo para la explotación comercial de bacterias termófilas y, por tanto, la selección de cepas resistentes al etanol es de gran importancia. Sin embargo, un mutante resistente al etanol de *Clostridium thermohydrosulfuricum*, 39EA, puede crecer a unas concentraciones de etanol de hasta 8% (en p/v) a 45 °C, y de hasta 3,3% (en p/v) a 68 °C (Lovitt *et al.*, 1984), y una cepa mutante de *Thermoanaerobacter ethanolicus*, 39E-H8, muestra una tolerancia al etanol del 8% a 60 °C (Burdette *et al.*, 2002). BG1 es muy tolerante al etanol a 70 °C, cuando se compara con otras cepas anaerobias termófilas (Herrero y Gómez, 1980; Larsen *et al.*, 1997; Lovitt *et al.*, 1988; Wiegel y Ljungdahl, 1981; Rani *et al.*, 1996). A 2,8% de etanol exógeno, la velocidad de crecimiento aún es del 27% de la velocidad sin etanol añadido, en un cultivo no adaptado.

Se ha divulgado que *Thermoanaerobacter ethanolicus* E39 consume etanol añadido de modo exógeno utilizando la alcohol primario deshidrogenasa (Burdette *et al.*, 2002). Este es el caso incluso en el mutante tolerante al etanol E39-H8, que no tiene (o tiene menor) actividad alcohol primario deshidrogenasa. En contraste, se ha descubierto que BG1 produce etanol incluso a altas concentraciones de etanol exógeno. Se descubrió que la producción de lactato aumenta en BG1 cuando se añade etanol. La producción de etanol a altas concentraciones de etanol es fundamental para los microorganismos que producen etanol.

En oposición a los sustratos almidonados o celulósicos, que casi exclusivamente son degradados a glucosa, la biomasa lignocelulósica contiene varios monómeros de azúcares diferentes, que incluyen hexosas y pentosas. Si estos deben convertirse en un producto de la fermentación, tal como etanol, en un procedimiento continuo, es necesario que todos los azúcares se capten y se metabolicen simultáneamente. La cofermentación ha demostrado ser problemática en muchos de los microorganismos productores de etanol tradicionales. *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* han podido ser modificados con éxito para la cofermentación de glucosa y xilosa, pero las cofermentaciones con arabinosa parecen mucho más problemáticas (Dien *et al.*, 2000; Lawford y Rousseau, 2002; Ho *et al.*, 1998). En bacterias gram-positivas en las que se ha estudiado el metabolismo del carbono a nivel molecular, se ha demostrado que la glucosa inhibe la transcripción de operón xylAB que codifica las enzimas responsables del metabolismo inicial de la xilosa, mediante represión de catabolitos (Hueck y Hillen, 1995). Por contraste, la transcripción del operón xylAB de *Thermoanaerobacter ethanolicus* no se ve reprimida por la glucosa, y se observa una degradación simultánea de la glucosa y la xilosa (Erbeznik *et al.*, 1998). Como se muestra en los ejemplos, BG1 degrada la mezcla de azúcares de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa simultáneamente, así como la mezcla de glucosa, xilosa, galactosa y manosa.

La hidrólisis de biomasa lignocelulósica produce la liberación de inhibidores microbianos (Klinke *et al.*, 2004) y, por tanto, el lavado del hidrolizado puede aumentar la productividad de etanol de BG1. Sin embargo, en los experimentos que aparecen en los ejemplos, el lavado disminuye significativamente la productividad de etanol de BG1. Es probable que este efecto sea provocado por el lavado de los pentosanos, fácilmente fermentables, disminuyendo con ello la concentración inicial de azúcares. En un estudio similar con madera de álamo temblón pretratada, se demostró que el lavado elimina con eficacia a los inhibidores, pero también produce una pérdida drástica del 75% de pentosanos disponibles (Saddler y Chan, 1984). La presencia de inhibidores en la hidrólisis no parece ser un obstáculo importante para las fermentaciones de BG1, y parece que BG1 tiene una gran ventaja frente a los microorganismos productores de etanol tracionales en hidrolizados lignocelulósicos no desintoxicados concentrados.

En los siguientes ejemplos se demuestra que la cepa base BG1, en realizaciones ventajosas, puede modificarse

para obtener mutantes o derivados de BG1 con características mejoradas. Así, en una realización se proporciona una cepa bacteriana según la invención que es un variante o mutante de BG1, en el que uno o más genes se han insertado, deletado o sustancialmente inactivado. Los genes pueden insertarse, deletarse o sustancialmente inactivarse empleando herramientas de manipulación de genes y procedimientos de ingeniería genética adecuados que son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, sistemas de clonación de genes, recombinación homóloga y las técnicas descritas en Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En particular, los presentes inventores han descubierto, de modo sorprendente, que la capacidad productora de etanol de BG1 puede aumentar significativamente inactivando el gen que codifica la lactato deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27). Así, se descubrió que la producción de etanol, cuando se cultiva sobre glucosa, aumenta en aproximadamente 51-56% del rendimiento máximo teórico en BG1 de tipo salvaje, a aproximadamente 84-91% en la cepa deficiente en lactato deshidrogenasa BG1L1.

Por tanto, se contempla que la cepa según la invención puede ser una versión modificada de BG1, en la que el gen que codifica la lactato deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27) ha sido inactivado mediante la delección de dicho gen, o en el que el gen ha sido sustancialmente inactivado por la mutación, delección o inserción de uno o más aminoácidos en el gen.

En una realización, se proporciona una cepa mutante deficiente en lactato deshidrogenasa BG1L1 que se ha depositado según los términos del Tratado de Budapest el 17 de mayo de 2006 en DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, con el n.º de registro DSMZ 18283.

Tal como se mencionó anteriormente, el ácido láctico (o lactato) se emplea ampliamente, por ejemplo, en la industria alimentaria y, así, es un producto de la fermentación valioso. Los presentes inventores han descubierto que la cepa de tipo salvaje BG1 puede modificarse para producir mayor cantidad de lactato, comparado con el tipo salvaje, mediante la inactivación del gen que codifica la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (EC 1.2.7.1). Así, se ha descubierto que el metabolismo de BG1 de tipo salvaje puede desplazarse completamente de la producción de etanol a la producción de lactato. Por tanto, la cepa de la invención puede ser una cepa derivada de BG1, en la que un gen que codifica la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (EC 1.2.7.1.) se ha infrarregulado o sustancialmente inactivado, por ejemplo, inactivado mediante la mutación, delección o inserción de uno o más aminoácidos en el gen. De modo más específico, se proporciona un derivado de BG1 que tiene mayores características de producción de lactato que se denomina BG1PF1, y que se ha depositado según los términos del Tratado de Budapest el 17 de mayo de 2006 en DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, con el n.º de registro DSMZ 18282.

El hidrógeno se emplea ampliamente en la industria química y del petróleo, a saber, para el procesamiento de combustibles fósiles, para la hidroalquilación, la hidrosulfurización y el hidrofraccionamiento, y se emplea para la hidrogenación de grasas y aceites (que se encuentran en artículos como la margarina), y en la producción de metanol. Por consiguiente, el hidrógeno puede utilizarse como fuente de energía y puede quemarse, por ejemplo, en motores de combustión.

El ácido acético es un producto valioso que se emplea ampliamente en la industria, principalmente para la producción de monómeros de acetato de vinilo, la producción de ésteres, vinagres y para su uso como disolvente. La demanda global de ácido acético es de aproximadamente 6,5 millones de toneladas anuales.

Los presentes inventores han construido una cepa mutante de BG1 mejorada que es capaz de producir más hidrógeno y más ácido acético en forma de acetato que la cepa de tipo salvaje BG1. Esto se realizó mediante la infrarregulación del gen HydABCD que codifica la hidrogenasa de BG1.

Así, la cepa de la invención puede ser una cepa mutante o derivado de BG1, en la que un gen que codifica una hidrogenasa o una subunidad de hidrogenasa se ha infrarregulado o sustancialmente inactivado. La inactivación del gen puede realizarse mediante mutación, delección o inserción de uno o más aminoácidos en el gen. De modo más específico, el gen que codifica la hidrogenasa o una subunidad de hidrogenasa puede seleccionarse de [Fe]-hidrogenasas e [NiFe]-hidrogenasas (EC 1.6.5.3, EC 1.12.7.2, EC 1.12.99.6), tales como NuoE, NuoF, NuoG, EchB, EchC, EchD, EchE y EchF.

Por consiguiente, en una realización se proporciona una cepa según la invención que tiene mejores capacidades de producción de hidrógeno y ácido acético que se denomina BG1H1. BG1H1 se ha depositado según los términos del Tratado de Budapest el 17 de mayo de 2006 en DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, con el n.º de registro DSMZ 18281.

También se contempla que, en ciertas realizaciones, puede resultar útil infrarregular o sustancialmente inactivar un

gen que codifica una acetato quinasa (EC 2.7.2.1) y/o una fosfato acetiltransferasa (EC 2.3.1.8) en BG1 o sus mutantes. La inactivación puede realizarse mediante mutación, delección o inserción de uno o más aminoácidos en dichos genes.

5 Como se mencionó anteriormente, BG1 posee la maquinaria genética para permitirle convertir azúcares de hexosa y azúcares de pentosa en una serie de productos de la fermentación, que incluyen etanol.

10 Sin embargo, para ciertas realizaciones puede desearse insertar uno o más genes adicionales a la cepa según la invención. Así, para mejorar el rendimiento del producto de la fermentación específico, puede resultar beneficioso insertar uno o más genes que codifican un polisacárido en la cepa según la invención. Por tanto, en realizaciones específicas, se proporciona una cepa según la invención en la que uno o más genes codifican una polisacarasa, que se selecciona de celulasas (tales como EC 3.2.1.4); beta-glucanasas, que incluyen glucano 1,3-beta-glucosidasas (exo-1,3-beta-glucanasas, tales como EC 3.2.1.58), 1,4-beta-celobiohidrolasa (tal como EC 3.2.1.91) y endo-1,3(4)-beta-glucanasas (tales como EC 3.2.1.6); xilanasas, que incluyen endo-1,4-beta-xilanasas (tales como EC 3.2.1.8) y xilano 1,4-beta-xilosidasa (tal como EC 3.2.1.37); pectinasas (tales como EC 3.2.1.15); alfa-glucuronidasa, alfa-L-arabinofuranosidasa (tal como EC 3.2.1.55), acetilesterasa (tal como EC 3.1.1.-), acetilxilanesterasa (tal como EC 3.1.1.72), alfa-amilasa (tal como EC 3.2.1.1), beta-amilasa (tal como EC 3.2.1.2), glucoamilasa (tal como EC 3.2.1.3), pululanasa (tal como EC 3.2.1.41), beta-glucanasa (tal como EC 3.2.1.73), hemicelulasa, arabinosidasa, mananasas, que incluyen manano endo-1,4-beta-manosidasa (tal como EC 3.2.1.78) y manano endo-1,6-alfa-manosidasa (tal como EC 3.2.1.101), pectina hidrolasa, poligalacturonasa (tal como EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasa (tal como EC 3.2.1.67) y pectato liasa (tal como EC 4.2.2.10).

20 Dependiendo del producto de la fermentación deseado, se contempla que, en ciertas realizaciones, resulte útil insertar genes heterólogos que codifican una piruvato descarboxilasa (tal como EC 4.1.1.1), o insertar un gen heterólogo que codifica una alcohol deshidrogenasa (tal como EC 1.1.1.1, EC 1.1.1.2, EC 1.1.1.71, o EC 1.1.99.8), o sobrerregular un gen ya existente que codifica una alcohol deshidrogenasa.

25 Según la invención, también se proporciona un procedimiento para producir un producto de la fermentación, que comprende cultivar una cepa según la invención bajo condiciones adecuadas.

30 La cepa según la invención es un microorganismo anaerobio estricto y, por tanto, se prefiere que el producto de la fermentación sea producido mediante un procedimiento de fermentación bajo condiciones anaerobias estrictas. Además, la cepa según la invención es un microorganismo termófilo y, por tanto, el procedimiento puede realizarse de modo óptimo cuando se realiza a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 40-95 °C, tal como el intervalo de aproximadamente 50-90 °C, que incluye el intervalo de aproximadamente 60-85 °C, tal como el intervalo de aproximadamente 65-75 °C.

Para la producción de ciertos productos de la fermentación puede resultar útil seleccionar un procedimiento de fermentación específico, tal como un procedimiento de fermentación discontinuo, que incluye un procedimiento de alimentación discontinua, o un procedimiento de fermentación continuo.

35 Según la invención, el procedimiento es útil para la producción de una amplia gama de productos de la fermentación, que incluyen ácidos, alcoholes, cetonas e hidrógeno. Así, pueden producirse productos de la fermentación, tales como etanol, butanol, propanol, metanol, propandiol, butandiol, ácido láctico, propionato, acetato, succinato, butirato, formiato y acetona, según la invención.

La invención se describirá con más detalle a continuación en los siguientes ejemplos no limitantes y figuras.

40 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1. Árbol filogenético basado en el análisis de la secuencia de ADNr 16s que muestra la posición de la cepa BG1 entre los *Clostridium* termófilos relacionados. *T.* es una especie de *Thermoanaerobacter*. *Tm.* es una *Thermoanaerobacterium*. La barra muestra 2% de sustituciones de nucleótidos.

45 Figura 2. Distribución del producto de una fermentación discontinua de 24 horas de BG1. ▲: xilosa (mM), Δ: lactato (mM), □: acetato (mM), ●: etanol (mM), ◆: hidrógeno (mM), ■: densidad celular (DO578).

Figura 3: efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento específica de la cepa BG1 cultivada de modo anaerobio y discontinuo con xilosa 5 g/l. Las desviaciones estándar de 3 mediciones independientes se muestran con barras.

50 Figura 4. Formación del producto de fermentaciones discontinuas de BG1 a diferentes pH. Δ: lactato (mM), □: acetato (mM), ●: etanol (mM).

Figura 5: Fermentaciones discontinuas con la cepa BG1 cultivada sobre medio BA con xilosa 5 g/l y

concentraciones variables de etanol añadido al medio. El rendimiento del producto en mM de producto por g de xilosa consumida se muestra como una función de la concentración inicial de etanol en el medio. □: acetato, Δ: lactato, ●: etanol.

5 Figura 6. Consumo de azúcar de BG1 en una fermentación discontinua con mezclas de azúcares como fuente de carbono. La concentración de azúcares de dos experimentos de mezclas de azúcares distintos (cada uno por duplicado) se muestra como una función del tiempo después de la inoculación con la cepa BG1. ■: glucosa, ▲: xilosa, ○: arabinosa, x: galactosa, □: manosa.

10 Figura 7. BG1 (símbolos blancos) y BG1L1 (símbolos negros) cultivados de modo discontinuo a concentraciones variables de glucosa. A: etanol (cuadrados), lactato (círculos) y acetato (triángulos) como una función de la concentración de etanol. B: recuperación de carbono de los experimentos mostrados en A.

Figura 8. BG1 (símbolos blancos) y BG1L1 (símbolos negros) cultivados de modo discontinuo a concentraciones variables de xilosa. A: etanol (cuadrados), lactato (círculos) y acetato (triángulos) como una función de la concentración de etanol. B: recuperación de carbono de los experimentos mostrados en A.

15 Figura 9. BG1 (símbolos blancos) y BG1L1 (símbolos negros) cultivados de modo discontinuo a concentraciones variables de etanol añadido de modo exógeno. A: etanol (cuadrados), lactato (círculos) y acetato (triángulos) como una función de la concentración de etanol. B: recuperación de carbono de los experimentos mostrados en A.

20 Figura 10. Abreviaturas en la tabla: HRT: tiempos de retención hidráulica, Glu: glucosa, Xil: xilosa, Ace: acetato, CGlu: glucosa consumida, CXil: xilosa consumida, CS: azúcares totales consumidos, YAce/TS: rendimiento de acetato (g/g de azúcares iniciales), YEtOH/TS: rendimiento de etanol (g/g de azúcares iniciales), YEtOH/TS: rendimiento de etanol de los azúcares iniciales corregido para la evaporación del etanol, QEtOH: productividad de etanol volumétrica, CR: recuperación de carbono.

Figura 11: Concentraciones de azúcares influentes de diversas suspensiones de hidrolizado de paja de trigo. Hidrolizado de paja de trigo no diluido: DM al 23%; azúcares solubles 77 g/l; glucosa 57 g/l; y xilosa 20 g/l.

25 Figura 12: Rendimientos del producto obtenido con BG1L1 en un FBR a 70 °C de diversas suspensiones de hidrolizado de paja de trigo.

Figura 13. Concentraciones de azúcares influentes (A) y conversiones de azúcares (B) de diversas suspensiones de hidrolizados de tallos de maíz triturados hidrolizados con ácido procedentes de un reactor de lecho fluido continuo con la bacteria anaerobia termófila BG1L1 inmovilizada a 70 °C.

30 Figura 14. Concentraciones del producto efluente (acetato y etanol) y concentración de acetato influente para diversas suspensiones de hidrolizados de tallos de maíz triturados hidrolizados con ácido procedentes de un reactor de lecho fluido continuo con la bacteria anaerobia termófila BG1L1 inmovilizada a 70 °C.

Figura 15. Rendimiento de etanol y recuperación de carbono para diversas suspensiones de hidrolizados de tallos de maíz triturados hidrolizados con ácido procedentes de un reactor de lecho fluido continuo con la bacteria anaerobia termófila BG1L1 inmovilizada a 70 °C.

35 Figura 16. Rendimiento de etanol y acetato para diversas suspensiones de hidrolizados de paja de trigo sometida a explosión en húmedo procedentes de un reactor de lecho fluido continuo con la bacteria anaerobia termófila BG1L1 inmovilizada a 70 °C.

40 Figura 17. Construcción utilizada para la delección de una región de 7762 pb, que contiene los genes que codifican la subunidad de piruvato ferredoxina oxidorreductasa, del cromosoma de BG1. up: una región cadena arriba de la piruvato ferredoxina oxidorreductasa de BG1. down: una región cadena abajo de la piruvato ferredoxina oxidorreductasa de BG1. HTK: un gen que codifica un módulo de resistencia a kanamicina muy termoestable.

Figura 18. Distribución de productos finales después de una fermentación discontinua a 70 °C con cinco clones independientes de BG1PF.

45 Figura 19. Construcción utilizada para la introducción de módulos antisentido en el cromosoma de BG1. up: una región cadena arriba de la lactato deshidrogenasa de BG1. down: una región cadena abajo del gen de la lactato deshidrogenasa. HTK: un gen que codifica un módulo de resistencia a kanamicina muy termoestable. prom: promotor, ter: terminador, un fragmento de 335 pb de hydA se clonó en la dirección antisentido en un sitio de clonación entre el promotor y el terminador.

50 Figura 20. Análisis de la transferencia Northern del ARN total aislado de BG1, BG1L1 y BG1H1 cultivado sobre glucosa o xilosa. El ARN se aisló a partir de células en crecimiento exponencial. Panel superior: se empleó una

sonda dirigida a *hydA* antisentido. Panel inferior: una sonda dirigida a la parte *hydA* del ARNm de *hyd*. A la derecha se muestran las bandas del marcador de tamaño del ARN.

Figura 21. Crecimiento, consumo de xilosa, acetato, lactato, etanol y producción de hidrógeno de BG1 (cuadrados blancos y negros), BG1L1 (triángulos) y BG1H1 (círculos blancos y negros), en cultivos discontinuos.

5 Ejemplos

Materiales y procedimientos

En los siguientes ejemplo se aplicaron los siguientes materiales y procedimientos.

Cepas y condiciones de cultivo

10 La cepa BG1 se aisló de modo anaerobio a partir de un manantial de agua caliente islandés a 70 °C. Todas las cepas se cultivaron a 70 °C de modo anaerobio en medio mínimo (BA) con extracto de levadura 2 g/l (como en Larsen *et al.*, 1997), a menos que se indique lo contrario. Para el medio sólido se utilizaron tubos de rodillo (Hungate R. E., 1969; Bryant M. P., 1972) que contenían medio BA con fitagel 11 g/l y también MgCl₂·6H₂O 3,8 g/l. Para la clonación se empleó *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen, EEUU). Top10 se cultivó rutinariamente a 37 °C en medio Luria-Bertani (Ausubel *et al.*, 1997) suplementado con ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml cuando resultó necesario.

Reactores continuos

20 Se preparó el medio de fermentación utilizado para el cultivo continuo y se suplementó con los mismos minerales, oligoelementos y extracto de levadura que los descritos anteriormente. El pH inicial del medio se ajustó a 7,4-7,7 y se sometió a un autoclave a 120 °C durante 30 min. Para asegurar las condiciones anaerobias, el medio se enjuagó durante 45 minutos con una mezcla de N₂/CO₂ (4:1) y, por último, se inyectó Na₂S en la botella para obtener una concentración final de 0,25 g/l.

25 El reactor era una columna de vidrio con una camisa de agua con un diámetro interno de 4,2 cm y una altura de 20 cm. El volumen de trabajo del reactor era de 200 ml. El influente entra desde el fondo del reactor, y la alimentación se controla mediante una bomba peristáltica (modelo 503S-10 rpm, Watson Marlow, Falmouth, Reino Unido). El flujo de recirculación se logra utilizando una bomba peristáltica idéntica (modelo 503-50 rpm, Watson Marlow, Falmouth, Reino Unido), con un grado de recirculación adecuado para asegurar unas velocidades de flujo hacia arriba en el reactor de 1 m/h. El pH se mantuvo a 7,0 mediante la adición de NaOH (1-2 M), a menos que se indique lo contrario. El reactor se cargó con 75 ml de material vehículo y, por último, el sistema de reactor completo, incluyendo las tuberías y el depósito de recirculación, se sometió a un autoclave a 120 °C durante 30 min. Las muestras líquidas se tomaron de los puertos de toma de muestras localizados en la parte superior del reactor, cerca de la salida del reactor. Los experimentos se realizaron a 70 °C mediante calentamiento externo y recirculación de agua caliente en la camisa de vidrio.

35 Durante los experimentos, una vez se alcanza un estado estacionario, se cambian las concentraciones de azúcares o HRT. El criterio para las condiciones de estado estacionario fueron que todos los parámetros debían mantenerse constantes durante al menos cinco tiempos de residencia. La actuación del reactor en los diferentes estados estacionarios se controló midiendo las concentraciones de azúcares y de productos finales de la fermentación. Durante el experimento se emplearon jeringas y agujas estériles para tomar las muestras del influente y del efluente, y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Se tomaron muestras del gas efluente para determinar el contenido en dióxido de carbono e hidrógeno.

40 *Ensayo para la contaminación*

Se tomó una muestra de 1 ml del reactor y se purificó el ADN cromosómico utilizando el kit de purificación de ADN de A&A Biotech (Polonia). Se establecieron las reacciones de PCR utilizando la polimerasa Pfu (MBI Fermentas, Alemania) y los cebadores B-all 27F (SEQ ID NO:1; GAG TTT GAT CCT GGC TCA G) y B-all 1492R (SEQ ID NO:2; ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT), que se hibridan con el ADNr bacteriano. Los fragmentos se purificaron utilizando el kit Qiaex II de Qiagen, se trataron con PNK (MBI Fermentas), se clonaron en pBluescript SK+ (Stratagene) tratado con CIAP (MBI Fermentas), y se transformaron en *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen). Se escogieron 50 clones y las inserciones se amplificaron utilizando los cebadores B-all 27F y B-all 1492R. Los fragmentos resultantes se digirieron con las enzimas de restricción *AluI* y *MboI* (MBI Fermentas), y se ensayaron sobre un gel de agarosa al 3%. Sólo se descubrió un patrón de digestión. Dos fragmentos se enviaron para la secuenciación (MWG Biotech, Alemania) y se identificaron como la cepa A10. También se realizaron reacciones de PCR utilizando los cebadores *ldhwc1* y *ldhccw2* que se hibridan con regiones cadena arriba y cadena abajo de la lactato deshidrogenasa, respectivamente. Por lo demás, se utilizaron las mismas condiciones de reacción que para

los cebadores B-all. Los fragmentos obtenidos se clonaron (como anteriormente), y 26 fueron analizados mediante polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. De nuevo, solo se produjo un patrón. Dos fragmentos fueron secuenciados.

Procedimientos analíticos

- 5 Las cepas se cultivaron en medio BA sin antibióticos de modo discontinuo durante 24-48 horas, tal como se ha mencionado. Los sobrenadantes del cultivo se analizaron para la glucosa, xilosa, acetato, lactato y etanol empleando una columna de análisis de ácidos orgánicos (columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad)) con una HPLC de Hewlett Packard serie 1100 a 65 °C con H₂SO₄ 4 mM como eluyente.

Enzimas y reactivos

- 10 Si no se indica lo contrario, las enzimas fueron suministradas por MBI Fermentas (Alemania) y se emplearon según las recomendaciones del suministrador. Las reacciones de PCR se realizaron con una mezcla de 1 unidad:1 unidad de polimerasa *Taq* y polimerasa *Pfu*. Los productos químicos fueron de calidad molecular y se obtuvieron en Sigma-Aldrich Sweden AB.

Análisis de ARNr 16S

- 15 Se recogieron 200 µl de un cultivo realizado durante la noche de BG1, se trataron durante 2 minutos con microondas al efecto máximo, y se emplearon como moldes de la PCR. Un ADNr 16S de 1500 pb se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores B1 (GAG TTT GAT CCT GGC TCA G) (SEQ ID NO:3) y B2 (ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT) (SEQ ID NO:4). El fragmento de PCR con extremos romos se trató con polinucleótido quinasa y se clonó en el vector pBluescript SK+ (Stratagen) tratado con CIP (fosfatasa intestinal de ternero) y digerido con *Sma*I. Se analizaron 24 clones del banco de ADN resultante mediante análisis de fragmentos de enzimas de restricción utilizando las enzimas de restricción *Alu*I, *Mbo*I y *Hin*6I. Se enviaron 6 fragmentos para la secuenciación a MWG-Biotech (Alemania). El alineamiento se realizó utilizando VectorNTi y se dibujó el árbol utilizando el programa MEGA2 (Kumar *et al.*, 2001).
- 20

Técnicas analíticas

- 25 Los sobrenadantes del cultivo se analizaron para la celobiosa, glucosa, xilosa, acetato, lactato y etanol utilizando una columna de análisis de ácidos orgánicos (columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU)) con una HPLC a 65 °C con H₂SO₄ 4 mM como eluyente. Las mediciones de etanol y acetato se validaron utilizando una cromatografía de gases con detección de ionización de llama. Los azúcares mezclados se midieron con una HPLC empleando una columna Phenomenex, RCM Monosaccharide (00H-0130-KO) a 80 °C con agua como eluyente. La manosa y la arabinosa no pudieron distinguirse con este sistema y, por tanto, se ensayaron en cultivos separados. El hidrógeno se midió utilizando un cromatógrafo de gases GC82 (MikroLab Aarhus, Dinamarca).
- 30

*Construcción del módulo de inactivación de *ldh**

- La construcción de inactivación final, p3CH, contiene 1) un fragmento de ADN cadena arriba del gen *I-ldh* de BG1, amplificado utilizando los cebadores *ldhup1F* (SEQ ID NO:5; 5'-TTCCATATCTGTAAGTCCCGCTAAAG) y *ldhup2R* (SEQ ID NO:6; 5'-ATTAATACAATAGTTTTGACAAATCC), 2) un gen que codifica la resistencia a kanamicina muy termoestable amplificado a partir del plásmido pUC18HTK (Hoseki *et al.*, 1999), y 3) un fragmento de ADN cadena abajo del gen *I-ldh* de BG1, amplificado utilizando los cebadores *ldhdown3F* (SEQ ID NO:7; 5'-ATATAAAAAGTCACAGTGTGAA) e *ldhdown4R* (SEQ ID NO:8; 5'-CACCTATTTTGCACCTTTTTTTC). El plásmido p3CH se linealizó y se electroporó en BG1.
- 35

- 40 *Construcción de la construcción antisentido de hidrogenasa*

El fragmento de ADN de SEQ ID NO:9 que contiene el módulo antisentido de hidrogenasa A se insertó en p3CH.

*Construcción del módulo de inactivación de *pfor**

- La construcción de inactivación final, pPF, contiene 1) un fragmento de ADN cadena arriba del gen *I-ldh* de BG1, amplificado utilizando los cebadores (SEQ ID NO:10; 5'-GAGGATTTAAGAAGGGGAGTTGG) y *pforup2R* (SEQ ID NO:11; 5'-ATTTCATCTCCCCCTGGATAAAG), 2) un gen que codifica la resistencia a kanamicina muy termoestable amplificado a partir del plásmido pUC18HTK (Hoseki *et al.*, 1999), y 3) un fragmento de ADN cadena abajo del gen *I-ldh* de BG1, amplificado utilizando los cebadores *pfordown3F* (SEQ ID NO:12; 5'-CGAGAGCTGATTCCCACGAAGA) y *pfordown4R* (SEQ ID NO:13; 5'-CAGACTACTACAACCTGGATCTAGC). El plásmido p3PF se linealizó y se electroporó en BG1.
- 45

- 50 *Electroporación de BG1*

Todas las manipulaciones, excepto para el acontecimiento de electroporación, se realizaron bajo condiciones anaerobias. Para la preparación de las células competentes se inocularon 15 ml de BA modificado con extracto de levadura 2 g/l y xilosa 5 g/l con un cultivo ON fresco de BG1 a una DO578 de 0,1, y se incubó a 70 °C. A DO578= 0,5, las células se enfriaron en hielo, se recolectaron (3500 rpm, 35 min, 4 °C) y se resuspendieron en 10 ml de tampón EP frío (sacarosa 0,3 M, glicerol al 10%, Na₂S 3,20 nM, pH 7, enjuagado con N₂ gaseoso estéril). El lavado se repitió y, por último, el sedimento se resuspendió en 4 ml de tampón EP sin Na₂S. Las células se almacenaron a -80 °C en partes alícuotas. Se trasladaron 0,2 ml de células competentes a cubetas de electroporación (separación de electrodos 0,1 cm) que contenían 2 µg de ADN plasmídico linealizado y se sometieron a un pulso de 25 µF, 500 ohm, y 2,0 kV. Las células se trasladaron a botellas de suero anaerobias que contenían 10 ml de medio BA con extracto de levaduras 2 g/l. Se dejó que las células electroporadas se recuperasen a 70 °C durante 16 horas. Después se diluyeron 10 veces en medio BA que contenía kanamicina 35 µg/ml. Después de 24 horas se repitió la transferencia hacia el medio que contenía kanamicina, y el cultivo se hizo crecer durante 24 horas a 70 °C. Utilizando la técnica de Hungate (Bryant M. P., 1972; Hungate R. E., 1969) se trasladaron 0,5 ml del cultivo a tubos de rodillo con 35 µg/ml de kanamicina. Después de 2 días de incubación a 70 °C, las colonias se seleccionaron y se inocularon en medio BA sin antibióticos. El ADN cromosómico se purificó a partir de 4 clones individuales recombinantes y de BG1 de tipo salvaje. Un fragmento de 2,1 kb se amplificó a partir del ADN cromosómico utilizando los cebadores *ldhcw1* e *ldhccw2*, apareándose justo cadena arriba y justo cadena abajo del gen *ldh*, respectivamente. Estos fragmentos se analizaron mediante digestiones con enzimas de restricción y se secuenciaron. Las reacciones de PCR que emplean cebadores *l-ldh* internos solo producen productos cuando se emplea BG1 de tipo salvaje como molde.

Análisis de la transferencia Northern

El ARN se purificó a partir de 50 ml de células de *Thermoanaerobacter* en crecimiento exponencial utilizando el kit Total ARN de A&A Biotechnology (Polonia), según recomienda el fabricante. Se ensayaron 5 µg de ARN total en geles de agarosa al 1% que contenían tiocianato de guanidina 80 mM (transferencias de ARNm) o geles de acrilamida desnaturizante al 5% (transferencias antisentido). La transferencia se realizó utilizando el sistema TurboBlotter (Scleicher & Schuell BioScience GmbH, Alemania) según las recomendaciones. La hibridación se realizó utilizando la disolución Ultrahyb de Ambion, Inc. (TX, EEUU), y los lavados se realizaron según procedimientos convencionales (Ausubel *et al.*, 1997). Las sondas sentido y antisentido se transcribieron a partir de pSKPhydD (el mismo fragmento de *hydD* utilizado en la construcción antisentido, pero sin las secuencias de promotor y terminador, insertado en el MCS de pBluescript SK+ (Invitrogen)) utilizando α-P³²CTP marcado.

Rendimiento y recuperación de carbono

Se calculó la recuperación de carbono y los rendimientos máximos teóricos basándose en las siguientes reacciones (no se incluyen las conversiones de ATP y NAD(P)+):

glucosa 1 M → lactato 2 M,

glucosa 1 M → acetato 2 M + CO₂ 2 M,

glucosa 1 M → etanol 2 M + CO₂ 2 M,

xilosa 3 M → lactato 5 M,

xilosa 3 M → acetato 5 M + CO₂ 5 M,

xilosa 3 M → etanol 5 M + CO₂ 5 M

Los rendimientos máximos teóricos del etanol a partir de glucosa y xilosa son, por tanto, 2 y 1,67 moles por mol, respectivamente.

Las recuperaciones de carbono se calcularon como:

$$\frac{3 \times (\text{lactato mM} + \text{acetato mM} + \text{etanol mM producido}) \times 100\%}{n \times (\text{sustrato mM consumido})}$$

en la que n es 5 para xilosa y 6 para glucosa.

Ejemplo 1

Análisis de 16S de BG1

Se construyó un banco de fragmentos de ADNr 16S de 1500 pb de la cepa BG1 y se analizó mediante análisis de

polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción para diferentes secuencias. Solo se encontró un patrón de digestión y se secuenciaron 6 clones. Las seis secuencias eran idénticas, y la búsqueda de homología de ADN en www.ncbi.nlm.nih.gov colocó a la cepa BG1 en el grupo de *Thermoanaerobacter mathranii*, que ahora consiste en las cepas A3 y BG1. La secuencia de ADNr 16S de BG1 se muestra en la lista de secuencias como SEQ ID NO:14. Excepto por siete posiciones no secuenciadas en la secuencia de GenBank (Benson *et al.*, 2005) de la cepa A3, las dos cepas tienen idénticas secuencias de ADNr 16S. Tal como muestra la figura 1, los parientes más cercanos son *Thermoanaerobacter thermocopriae* (98% de coincidencia), *Thermoanaerobacter acetoethylicus* (95%) y *Thermoanaerobacter italicus* (95%). BG1 está muy relacionado con la cepa A3 de *Thermoanaerobacter mathranii* (Larsen *et al.*, 1997). Esto coloca a BG1 en el agrupamiento V de los *Clostridium*, tal como se ha descrito previamente (Collins *et al.*, 1994). Aunque las cepas están muy relacionadas, son muy diferentes con respecto a la tolerancia a hidrolizados hemicelulósicos. A3 solo puede crecer en hasta 40% de hidrolizado de paja de trigo (de 60 g/l de peso seco de paja de trigo suplementada con xilosa), mientras que BG1 puede crecer y producir etanol a partir de un hidrolizado sin diluir sin la adición de azúcares o enzimas. Además, se ha divulgado que la cepa A3 no es capaz de crecer sobre galactosa (Larsen *et al.*, 1997), mientras que BG1 crece bien y produce principalmente etanol con la galactosa como única fuente de carbono (los datos no se muestran).

Ejemplo 2

Productos de la fermentación de BG1

BG1 fue cultivado de modo anaerobio y discontinuo durante 24 horas con xilosa 27 mM como única fuente de carbono (figura 2). En las primeras cuatro horas de la fermentación se produjeron cantidades casi iguales de acetato y etanol. Entre las 4 y 6 horas de crecimiento, la producción de etanol aumenta con relación al acetato, y en la fase exponencial tardía o en la fase estacionaria, se produjo casi exclusivamente etanol. Solo se produjo una pequeña cantidad de lactato durante el experimento. La producción de hidrógeno parece seguir a la producción de acetato, produciéndose unas cantidades aproximadamente equimolares de los dos compuestos.

Ejemplo 3

Temperatura, pH y tolerancia al etanol de BG1

Tal como puede observarse en la figura 3, la temperatura óptima de la cepa BG1 es de aproximadamente 70 °C, que es la misma que la temperatura del manantial de agua caliente a partir del cual se aisló BG1. Se descubrió que BG1 crece en el intervalo de pH de pH = 5,0 a 7,5. La formación de producto a diferentes valores de pH del medio de cultivo se ensayó en experimentos discontinuos. Tal como muestra la figura 4, la producción de etanol fue favorecida en el intervalo de pH de 6,5 a 7,5, mientras que la producción de lactato fue predominante a un pH menor. El rendimiento óptimo del etanol fue de etanol 1,15 mM/mM de xilosa a pH = 6,5 y pH = 7,5. A pH 5,5, el rendimiento de etanol fue de 0,44 mM/mM. Esto se corresponde con 69% y 26% del rendimiento máximo teórico, respectivamente.

La tolerancia al etanol es muy importante para la producción de etanol. Se investigó la formación de producto a concentraciones elevadas de etanol exógeno. Tal como se muestra en la figura 5, los rendimientos de etanol disminuyeron drásticamente a mayores concentraciones de etanol. A 0% de etanol inicial en el medio, el rendimiento fue de etanol 1,05 mM/mM de xilosa consumida, mientras que a 2,8% de etanol fue de 0,31 mM/mM. Esta disminución en la producción de etanol se debió principalmente a una mayor producción de lactato (aumento en 6,4 veces), pero la producción de acetato también aumentó en 40%. Aparentemente, no se forman otros productos principales, puesto que las recuperaciones de carbono calculadas a partir de los rendimientos de acetato, etanol y lactato están en el intervalo de 92-99% en todas las concentraciones (los datos no se muestran).

Ejemplo 4

Cofermmentación de BG1 de azúcares de hemicelulosa

La captación y el metabolismo simultáneos de diferentes azúcares es un rasgo deseado, pero no muy habitual, en los microorganismos utilizados para la producción de etanol. BG1 fue ensayado de modo discontinuo con dos mezclas de azúcares diferentes, conteniendo cada una cuatro monómeros de azúcar de hemicelulosa diferentes, para estudiar si los monómeros mezclados pueden metabolizarse de modo simultáneo (figura 6). La manosa y la arabinosa no pueden distinguirse en el sistema de HPLC de los inventores y, por tanto, se ensayaron en mezclas separadas. Tal como puede observarse en la figura 6, se observó una degradación simultánea de todos los azúcares añadidos entre las 6 y 8 horas de crecimiento. La velocidad de degradación de la xilosa fue tan elevada como la de la glucosa, aunque la aparición de la degradación de la xilosa estuvo ligeramente retrasada. La galactosa y la arabinosa fueron las últimas en degradarse, y la velocidad de la degradación fue más lenta que las velocidades de la glucosa y la xilosa. La velocidad de la degradación de la manosa fue la más rápida observada pero, de nuevo, la aparición de la degradación estuvo retrasada comparada con la glucosa.

Ejemplo 5*BG1L1 y BGL2: delección del gen *l-dh* de BG1*

Para evitar la formación de lactato, se delecionó el L-LDH de BG1. El plásmido pKHF3rev purificado, que contiene el gen de resistencia a kanamicina termoestable flanqueado por las regiones cadena arriba y cadena abajo de *ldh*, se linealizó y se electroporó en BG1, y se seleccionaron los recombinantes positivos utilizando el gen de resistencia a kanamicina termoestable. Se aislaron varios clones independientes y se verificaron mediante PCR. Los productos de la PCR de dos clones después se secuenciaron y se descubrió que contenían el módulo de resistencia a kanamicina en lugar del gen de la lactato deshidrogenasa, tal como se esperaba. Las dos cepas mutantes se denominaron BG1L1 y BG1L2.

La cepa BG1 de tipo salvaje y las dos cepas BG1L1 y BG1L2 se cultivaron sobre diferentes concentraciones de glucosa y xilosa para ensayar su actuación en la producción de etanol (figura 7 y 8). Para simplificar, solo se muestra BG1L1, pero la cepa paralela, BG1L2, muestra unos resultados muy similares e incluso tiene un rendimiento máximo ligeramente mayor sobre la xilosa que BG1L1.

Tal como puede observarse en la figura 7 y 8, la distribución del producto es muy distinta en el mutante. No se produce lactato detectable empleando glucosa o xilosa como sustrato, lo cual confirma la delección del gen de la lactato deshidrogenasa. También demuestra que el gen *ldh* descrito en la presente es el único gen *ldh* en BG1 o es el principal. La cepa BG1 de tipo salvaje responde a una mayor concentración de sustrato aumentando la producción de lactato, en especial cuando se cultiva sobre xilosa. Se observa una correspondiente menor producción de etanol y acetato. La producción de acetato es constante o menor a mayores concentraciones de azúcares y, puesto que no puede producir lactato, se observa una producción de etanol creciente o alta constante. Los rendimientos de etanol son significativamente mejores en el mutante: sobre la glucosa, se observan unos rendimientos del 84-91% del máximo teórico en BG1L1, comparado con 51-56% en la cepa de tipo salvaje. Sobre la xilosa, los rendimientos de etanol de BG1L1 y BG1 de tipo salvaje fueron del 76-80% y 40-63%, respectivamente. Las recuperaciones de carbono fueron entre 91% y 106% (figuras 7B y 8B). Unas recuperaciones mayores que 100% probablemente surgen del metabolismo de los componentes del extracto de levaduras.

La figura 9 muestra la producción de etanol de BG1 comparada con BG1L a concentraciones crecientes de etanol en el medio. La cepa BG1 de tipo salvaje responde a concentraciones crecientes de etanol en el medio aumentando drásticamente la producción de lactato. La producción de acetato aumenta en aproximadamente dos veces. El rendimiento de etanol disminuye hasta solo 20% del rendimiento teórico máximo cuando se añade etanol al 2,85 (en v/v). En BG1L no hay producción de lactato, y la producción de acetato no aumenta significativamente a mayores concentraciones de etanol. Como resultado, el rendimiento de etanol es alto a todas las concentraciones de etanol en el medio. De hecho, el mayor rendimiento medido es 84% del máximo teórico a 1,95% de etanol añadido, y a 2,8% de etanol, el rendimiento aún es del 72%. Las recuperaciones de carbono fueron entre 84% y 99% (figura 6B). El experimento se repitió con el clon independiente BG1L2 con resultados similares.

Ejemplo 6*Fermentación continua de azúcares utilizando BG1L1*

Se investigó el potencial de la utilización de bacterias anaerobias termófilas inmovilizadas para la fermentación de etanol continua en un reactor de lecho fluido de escala de laboratorio que funciona a 70 °C (figura 10). Se estudió el efecto del tiempo de retención hidráulica (HRT) sobre la producción de etanol y la productividad a una corriente de alimentación con xilosa 10 g/l. Las concentraciones de producto y la conversión de xilosa casi no se vieron afectadas por la disminución gradual de HRT de 8 a 1 hora. La conversión de azúcares fue mayor que 97,8%, produciendo 0,33 g de etanol/g de azúcares iniciales, y la productividad del etanol aumentó gradualmente de 0,43 a 3,34 g/l/h. El segundo experimento se realizó para investigar la cofermentación de la glucosa y la xilosa. Ambos azúcares fueron convertidos de modo simultáneo y eficaz a etanol con una utilización de azúcares mayor que 90,6% en las mezclas de azúcares con hasta 54 g/l. A estas concentraciones de azúcares, la producción de etanol aumentó gradualmente, y la concentración máxima de etanol lograda fue de 15,35 g/l. Los rendimientos de etanol fueron de 0,28-0,40 g de etanol/g de azúcares iniciales. La máxima productividad de etanol obtenida fue de 1,1 g/l/h a HRT de 8 horas y 30 g/l de azúcares. Este estudio demuestra que es posible el cultivo de células inmovilizadas activas de bacterias anaerobias termófilas. El reactor se hizo funcionar de modo continuo durante 140 días sin contaminación y mostró una buena actuación a largo plazo.

Ejemplo 7*Fermentación continua de paja de trigo sometida a explosión de vapor utilizando BG1L1*

Se prepararon hidrolizados de paja de trigo sometida a explosión de vapor (SEWS) mediante una explosión de vapor, seguido de una hidrólisis enzimática (utilizando Celluclast y Novozyme 188 proporcionados por Novozymes A/S) para liberar los azúcares constituyentes, la glucosa y la xilosa. Los SEWS fueron proporcionados por ELSAM, Dinamarca. Los hidrolizados tenían un contenido en materia seca de 23% (DM), y la glucosa y la xilosa se encontraban a 57 g/l y 30 g/l, respectivamente. Para contrarrestar la contaminación bacteriana, el medio de hidrolizado de SEWS se calentó hasta 121 °C durante 1 minuto. Se prepararon dos suspensiones de SEWS mediante la adición del volumen respectivo de agua, dadas las concentraciones deseadas de 7,5% y 15% de DM que corresponden a mezclas de glucosa-xilosa de 12 y 43 g/l, respectivamente (figura 11). A pesar de que el medio de SEWS estaba esterilizado y desintoxicado, la cepa BG1L1 fue capaz también de cofermentar la glucosa y la xilosa de modo eficaz con un rendimiento de etanol relativamente alto de 0,39-0,4 g/g (figura 12). La glucosa fue utilizada completamente (>98%) en ambas suspensiones de SEWS ensayadas, mientras que la conversión de xilosa disminuye del 99% hasta 80% al 15% (DM) de SEWS, aunque la conversión global de los azúcares fue mayor que 90%. El acetato fue el principal subproducto y se mantuvo relativamente bajo durante toda la fermentación (0,07-0,08 g/g) (figura 12).

En todas estas fermentaciones, solo se produjeron cantidades pequeñas de lactato, tal como se esperaba puesto que la cepa es un mutante deficiente en lactato deshidrogenasa.

Durante ambos experimentos, que duraron aproximadamente 140 días, el reactor se comprobó de modo regular para la contaminación purificando el ADN cromosómico a partir de muestras del reactor, y no se descubrieron otras especies distintas a BG1L1. También se descubrió que la delección de la lactato deshidrogenasa era estable mediante la secuenciación de la región de la lactato deshidrogenasa.

Ejemplo 8

Fermentación continua de tallos de maíz triturados pretratados con ácido empleando BG1L1

Los hidrolizados de tallos de maíz triturados (PCS), preparados mediante hidrólisis con ácido sulfúrico diluido, fueron proporcionados por National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO, EEUU). El hidrolizado tenía un contenido en sólidos totales (TS) del 30% (en peso), y las concentraciones de xilosa, glucosa y ácido acético eran de 67 g/l, 15 g/l y 14 g/l, respectivamente. Se empleó un hidrolizado de tallos de maíz triturados en concentraciones del 2,5%-1,5% de TS. Debido a la baja concentración de azúcares totales en las suspensiones del hidrolizado de 2,5% y 5% de TS, se añadió más xilosa 5 g/l a estas suspensiones para evitar posibles problemas del procedimiento provocados por el contenido en azúcares relativamente bajo.

Con unas concentraciones de hidrolizado de PCS en el intervalo de 2,5-10% de TS, la producción de etanol aumentó gradualmente y se obtuvieron unos rendimientos de etanol relativamente altos y estables en el intervalo de 0,41-0,43 g/g (figura 15). Se logró una utilización de azúcares casi completa (mayor que 95%) para PCS de 2,5-7,5% de TS, mientras que a 10% (TS), la conversión de azúcares disminuyó hasta aproximadamente 85% (figura 16). A una concentración de PCS del 15% de TS, la conversión de azúcares fue del 70%, y se obtuvieron unos rendimientos de etanol relativamente elevados de cerca de 0,35 g/g. La menor conversión de azúcares a 15% (TS) de PCS (figura 13), comparado con las otras concentraciones de hidrolizado, puede atribuirse al crecimiento y la inhibición del producto provocados por el efecto combinatorio negativo de altas concentraciones de acetato, otros inhibidores presentes en el hidrolizado y la acumulación de sales resultante de la base añadida para el control del pH (Lynd *et al.*, 2001; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000; Zalvidar *et al.*, 2001). Sin embargo, el bajo rendimiento de etanol con PCS de 15% de TS (figura 15) probablemente fue debido a una mayor evaporación de etanol que la esperada, puesto que la recuperación de carbono fue baja (CR < 0,9).

La producción de acetato aumentó de aproximadamente 1 a 3,5 g/l (figura 4). Sin embargo, debido a las altas concentraciones iniciales de acetato (aproximadamente 1-7 g/l) en la corriente de alimentación, una concentración bastante alta de casi 10 g/l de acetato estaba presente en el efluente, lo cual es significativo con respecto al efecto inhibidor del ácido acético sobre la fermentación. Estos resultados claramente demuestran la alta tolerancia del organismo a los inhibidores metabólicos presentes en PCS no desintoxicado.

Ejemplo 9

BF1PF: un mutante productor de lactato de la cepa BG1

Se preparó una cepa derivada de BG1 mediante la integración del fragmento de ADN mostrado en la figura 20 en el cromosoma de BG1. El plásmido ppta32K purificado, que contiene el gen de resistencia a kanamicina termoestable flanqueado por las regiones cadena arriba y cadena abajo de *pfor*, se linealizó y se electroporó en BG1, y se seleccionaron los recombinantes positivos utilizando el gen de resistencia a kanamicina termoestable. Se aislaron varios clones independientes y se verificaron mediante PCR. Los productos de la PCR de dos clones después se secuenciaron y se descubrió que contenían el módulo de resistencia a kanamicina en lugar de los

genes *pfor*, tal como se esperaba.

Se cultivaron cinco clones independientes de BG1PF de modo discontinuo durante dos días con xilosa 5 g/l como única fuente de carbono. Como puede observarse en la figura 21, se observa un desplazamiento completo en el metabolismo, y la producción de lactato ahora es el principal producto de la fermentación.

5

Ejemplo 10

BG1H1: un mutante de BG1 con mayor producción de hidrógeno construido mediante la infrarregulación de la hidrogenasa de captación

Las hidrogenasas pueden estar implicadas en la producción y en la captación de hidrógeno. En BG1, se descubrieron dos secuencias con similitud a hidrogenasas conocidas. Una (*hydA* BG1) era 80,4% idéntica, al nivel de ADN, al gen *hydA* de *Thermoanaerobacter tengcongensis*, y 91,8% idéntica, al nivel de aminoácidos, con la correspondiente proteína HydA. La proteína HydA es una de la 4 subunidades de una hidrogenasa solo de Fe dependiente de NAD(H) citosólica de *T. tengcongensis* (1015). La actividad hidrogenasa dependiente de NADH es inhibida por una alta presión parcial de hidrógeno, mientras que las actividades aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa son mayores en *T. tengcongensis* cultivado a una $p(\text{H}_2)$ elevada. De modo similar, la producción de etanol está casi abolida en cultivos de fermentador con baja $p(\text{H}_2)$.

Se descubrió que la segunda secuencia en BG1 con similitud a las hidrogenasas era 73% idéntica al gen *echE* de *Thermoanaerobacter tengcongensis*, y 76% idéntica a la subunidad de la proteína EchE de la Ech hidrogenasa de *Thermoanaerobacter tengcongensis*. La Ech hidrogenasa es una hidrogenasa dependiente de ferredoxina [NiFe] que se encuentra en la fracción de las membranas de extractos de *Thermoanaerobacter tengcongensis*. Ambas hidrogenasas de *Thermoanaerobacter tengcongensis* son principalmente enzimas que desprenden hidrógeno.

En *Thermoanaerobacter* BG1, el producto principal es el etanol, tanto a alta como a baja $p(\text{H}_2)$. Por tanto, es probable que emplee una estrategia diferente para la producción de hidrógeno y de etanol. Se estudió el efecto de la infrarregulación de las dos hidrogenasas introduciendo módulos para la infrarregulación de la expresión de *echE* e *hydA* en el cromosoma de BG1. La construcción básica del módulo se muestra en la figura 22. Cuando el módulo se introduce en BG1, se elimina la lactato deshidrogenasa y el promotor se activa. Esto da como resultado la expresión de un pequeño transcrito complementario con el ARNm que contiene *hydA* y *echW*, respectivamente. Esta expresión, en la mayoría de los casos, produce unos menores niveles de ARNm debido a la digestión del ARN bicatenario.

La expresión del ARN antisentido de *hydA* y la correspondiente infrarregulación del ARNm de *hydA* se validó mediante transferencias Northern (figura 23). El ARN total se purificó de BG1, se trasladó a una membrana y se sondó con sondas complementarias a ARN antisentido y ARNm de *hydA*, respectivamente. Se ha demostrado que el promotor utilizado para expresar el ARN antisentido es reprimido por la glucosa y es inducido en presencia de xilosa. Según esto, el antisentido solo se observaría durante el crecimiento sobre xilosa. También se muestra la cepa BG1 de tipo salvaje y la cepa BG1L1, en la que *ldh* ha sido delecionada, pero no se ha insertado un antisentido, como controles. Tal como se esperaba, no se observó ARN antisentido de *hydA* en estas cepas. Se espera que el transcrito del operón *hydA* tenga una longitud de aproximadamente 500 b. Cuando se emplea una sonda dirigida al ARNm que contiene *hydA*, se observa una banda que migra a aproximadamente 6000-7000 b. También se observa una de dos bandas más pequeñas e intensas de aproximadamente 3000-4000 b, en particular cuando las células se cultivan con xilosa como fuente de carbono. La banda más pequeña probablemente es una hibridación cruzada con ARN 16S. El ARN que corresponde al ARN de 3-4000 b varía mucho en intensidad. El nivel de esta especie es mucho mayor durante el crecimiento sobre xilosa, comparado con la glucosa, y es mayor en la cepa con la lactato deshidrogenasa delecionada, comparado con el tipo salvaje. Cuando se cultiva sobre glucosa, los niveles de esta banda son iguales en BG1L1 y BG1H1, mientras que durante el crecimiento sobre xilosa, es mucho más intensa en la cepa en la que no se expresa ningún antisentido. Esto se corresponde muy bien con la expresión del ARN antisentido en el panel superior.

Tal como muestra la figura 24, BG1H1 produce más acetato, más hidrógeno, y menos etanol que las cepas control. Esto indica que la hidrogenasa HydABCD de BG1 está implicada en la captación de hidrógeno, más que en la producción, tal como se demostró para *Ta. tengcongensis*. Puesto que NAD(P)H es necesario para la reducción de acetilCoA a acetaldehído, y del acetaldehído a etanol, es probable que la HydABCD hidrogenasa esté implicada en la reducción de estos cofactores que emplean hidrógeno. Tanto el acetato como el hidrógeno son productos valiosos y, por tanto, la cepa BG1H1 puede preferirse si el objetivo es una mayor producción de hidrógeno y acetato.

50

Referencias

- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Wheeler, D. L. (2005), GenBank, Nucleic Acids Res., publicación de la base de datos 33 Issue, D34-D38.
- Bryant, F. O. (1991), Characterization of the fructose 1,6-bisphosphate-activated, L(+)-lactate dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *J. Enzyme Inhib.*, 5, 235-248.
- 5 Burdette, D. S., Jung, S. H., Shen, G. J., Hollingsworth, R. I., y Zeikus, J. G. (2002), Physiological function of alcohol dehydrogenases and long-chain (C(30)) fatty acids in alcohol tolerance of *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1914-1918.
- Carreira, L. H., Ljungdahl, L. G., Bryant, F., Szulczynski, M., y Wiegel, J. (1982), Control of product formation with *Thermoanaerobacter ethanolicus*, enzymology and physiology, en *Genetics of industrial microorganisms*, Y. Ikeda, ed., American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 351-355.
- 10 Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Córdoba, J. J., Fernández-Garayzabal, J., García, P., Cai, J., Hippe, H., y Farrow, J. A. (1994), The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 812-826.
- Cook, G. M. (2000), The intracellular pH of the thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter wiegellii* during growth and production of fermentation acids, *Extremophiles*, 4, 279-284.
- 15 Dien, B. S., Nichols, N. N., O'Bryan, P. J., y Bothast, R. J. (2000), Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 84-86, 181-196.
- Erbeznik, M., Dawson, K. A., y Strobel, H. J. (1998), Cloning and characterization of transcription of the xylAB operon in *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *J. Bacteriol.*, 180, 1103-1109.
- 20 Herrero, A. A. y Gómez, R. F. (1980), Development of ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*: effect of growth temperature, *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 571-577.
- Ho, N. W., Chen, Z., y Brainard, A. P. (1998), Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1852-1859.
- Hueck, C. J. y Hillen, W. (1995), Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria?, *Mol. Microbiol.*, 15, 395-401.
- 25 Klinke, H. B., Thomsen, A. B., y Ahring, B. K. (2004), Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 10-26.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., y Nei, M. (2001), MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software, *Bioinformatics*, 17, 1244-1245.
- 30 Lamed, R. y Zeikus, J. G. (1980), Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields of and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*, *J. Bacteriol.*, 144, 569-578.
- Larsen, L., Nielsen, P., y Ahring, B. K. (1997), *Thermoanaerobacter mathranii* sp nov, an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland, *Arch. Microbiol.*, 168, 114-119.
- 35 Lawford, H. G. y Rousseau, J. D. (2002), Performance testing of *Zymomonas mobilis* metabolically engineered for cofermentation of glucose, xylose, and arabinose, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98-100, 429-448.
- Lovitt, R. W., Longin, R., y Zeikus, J. G. (1984), Ethanol-Production by Thermophilic Bacteria - Physiological Comparison of Solvent Effects on Parent and Alcohol-Tolerant Strains of *Clostridium-Thermohydrosulfuricum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 171-177.
- 40 Lovitt, R. W., Shen, G. J., y Zeikus, J. G. (1988), Ethanol-Production by Thermophilic Bacteria - Biochemical Basis for Ethanol and Hydrogen Tolerance in *Clostridium-Thermohydrosulfuricum*, *J. Bacteriol.*, 170, 2809-2815.
- Lynd, L. R. (1989), Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria. Critical evaluation of potential and review, en *Advances in biochemical engineering/Biotechnology*, A. Fiechter, ed. (Nueva York: Springer Verlag), pp. 1-52.
- 45 Rani, K. S. y Seenayya, G. (1999), High ethanol tolerance of new isolates of *Clostridium thermocellum* strains SS21 and SS22, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 173-178.

Rani, K. S., Swamy, M. V., Sunitha, D., Haritha, D., y Seenayya, G. (1996), Improved ethanol tolerance and production in strains of *Clostridium thermocellum*, World J. Microbiol. Biotechnol., 12, 57-60.

5 Saddler, J. N. y Chan, M. K. H., Conversion of pretreated lignocellulosic substrates to ethanol by *Clostridium thermocellum* in mono- and co-culture with *Clostridium thermosaccharolyticum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*, Can. J. Microbiol., 30, 212-220, 1984.

Wiegel, J. y Ljungdahl, L. G., *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium, Arch. Microbiol., 128, 343-348, 1981.

ES 2 431 644 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Biogasol A/S	
	<120> CEPA BG1 de <i>THERMOANAEROBACTER MATHRANII</i>	
	<130> 16589	
5	<160> 14	
	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 19	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador B-all 27F	
15	<400> 1	
	gagtttgatc ctggctcag	19
	<210> 2	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> B-all 1492R	
	<400> 2	
	acggctacct tgttacgact t	21
30	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador B1	
	<400> 3	
40	gagtttgatc ctggctcag	19
	<210> 4	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador B2	
50	<400> 4	
	acggctacct tgttacgact t	21
55	<210> 5	
	<211> 26	
	<212> ADN	

ES 2 431 644 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Idhup1F	
5	<400> 5	
	ttccatatct gtaagtcccg ctaaag	26
10	<210> 6	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Idhup2R	
	<400> 6	
20	attaatacaa tagtttgac aaatcc	26
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Idhdown3F	
30	<400> 7	
	atataaaaag tcacagtg aa	22
	<210> 8	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Idhdown4R	
	<400> 8	
	cacctatfff gcactffff tc	22
45	<210> 9	
	<211> 973	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> módulo antisentido de hidrogenasa A	
	<400> 9	
55		

ES 2 431 644 T3

ctgcagcgcc gcgggatcat cgataagctt gatatcgaat tcctgcagcc cccccccatc 60
 ttcattgggaa ttcggagtat atgtcactcc gtggctttat tttttttatt tttttactca 120
 aaaaaggagg atttttttaa tatacgtcga atatatataa tataagtttg ttgaatcaat 180
 aaactattgg ggtggctata taaatgaaaa gaaaattaaa aaacagtgtc ggaatatggg 240
 catttggtag ccgacgggat ccgaactata gcaggagaag cattatctat agaatacttt 300
 atattttccc cttcaaacct tatttcattt actcctaatt ttttagacaa tgattgaagc 360
 tcacagttag tatttctaata acaagtcaaa caacttctat catgatttga aagtataagc 420
 tcaagattta atttccgcgc ttctcttatt ttagctgtat ttgtatacac tttcatgcca 480
 tcaaaataccg gataagtgca ggagggtttgt aaatttctaa ctccctctat ttcaactaca 540
 catatacggc aagcgccaat ttggttgatt tccttgaggt aacacagtgt ggggatatcg 600
 aattcctgca gcccggggga tccactagtt ctagagcggc cgcccacaaa agaattgtaa 660
 gaggcccttt tctcttcata cctgtagaaa ggggtctctt aattttctct tgaaatagaa 720
 tatatattcg gttattatat aggtataaat taactacacg cagtctttaa aaaaagaagt 780
 gatttgtatg gatataattg aaaaacttga ggtgcttggg gctgcccgtc ggtaccggtt 840
 gacggcggat atggtacaat gaacatggag acatgcaggg ttttcctgca tttttctttg 900
 tgcactcatc aagcgatfff cggtaaagct aggaggaaat gatgaaacga cgaatcagca 960
 tcgcaatcga cgg 973

<210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> pforup1F

10

<400> 10

gaggattaa gaaggggagt tgg

23

15

<210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> pforup2R

<400> 11

atttcatctc cccctggata aag

23

25

<210> 12
 <211> 22
 <212> ADN

ES 2 431 644 T3

<213> Artificial

<220>
<223> pfordown3F

5 <400> 12

cgagagctga ttcccacgaa ga 22

10 <210> 13
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> pfordown4R

<400> 13

20 cagactacta caactggatc tagc 24

<210> 14
<211> 1500
<212> ADN

25 <213> *Thermoanaerobacter mathranii*

<400> 14

gagtttgatc ctggctcagg acgaacgctg gcggcgtgcc taacacatgc aagtcgagcg 60

gtccggcact caacgtagtt gggtagcgga tagcggcgga cgggtgagta acgcgtgggc 120

aacctaccct taagaccggg atagcacctc gaaaggggtg gtaatactgg ataagctcct 180

tatagggcat cctatagga ggaaagggaa gcgcaagcta ccgcttaagg atgggcccgc 240

gtcccatcag ctagttggta gggtaacggc ctaccaaggc gacgacgggt agccggcctg 300

agaggggtgt cggccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag 360

tggggaatct tgggcaatgg gcggaagcct gaccagcga cggcgctgg gggaggaagg 420

ccttcgggtt gtaaaccctt ttagtggtgg aagaaggat gacggtacca cacgaaagcc 480

ccggctaact acgtgccagc agccgcggta agacgtaggg ggcgagcgtt gtccggaatt 540

actgggcgta aagggcgcgt aggcgggtcaa tcaagtcagg tgtaaaagac ccgggctcaa 600

cccgggggta gcatctgaaa ctgattggct agagggcagg agaggggagt ggaattcccg 660

ES 2 431 644 T3

gtgtagcggg	gaaatgcgta	gatatacggga	ggaataccag	tggcgaaggc	gactctctgg	720
actggccctg	acgctgaggc	gcgaaagcgt	ggggagcgaa	caggattaga	taccctggta	780
gtccacgctg	taaacgatgg	gtactaggtg	tggggcgcgg	aagcgttccg	tgccgtagcg	840
aacgcaataa	gtacccccgc	tggggagtac	ggccgcaagg	ttgaaactca	aaggaattga	900
cgggggcccg	cacaagcggg	ggagcatgtg	gtttaattcg	aagcaacgcg	aagaacctta	960
ccagggcttg	acatgcaggt	agtagcgaac	cgaaagggga	gcgaccttac	cgggaggtaa	1020
ggagcctgca	caggtggtgc	atggttgctg	tcagctcgtg	tcgtgagatg	ttgggttaag	1080
tcccgaacg	agcgcaaccc	ctgcctctag	ttgccagcgg	gtaagccggg	cactctaggg	1140
ggactgccgt	ggaggacacg	gaggaaggtg	gggatgacgt	caaatcatca	tgccctaaat	1200
gccctgggccc	acacacgtgc	tacaatggcc	ggtacagagg	ggagcgaagc	cgtgaggcgg	1260
agcgaatccc	aaaaagccgg	tccaagttcg	gattgcaggc	tgcaactcgc	ctgcatgaag	1320
tcggaatcgc	tagtaatcgc	ggatcagcat	gccgcgggtg	atacgttccc	gggccttgta	1380
cacaccgccc	gtcacaccac	gagagcctgc	gacacccgaa	gccggtgacc	caaccgggaa	1440
ggagggagcc	gtcgaaggtg	gggcaggtga	ttgggggtgaa	gtcgtaacaa	ggtagccgta	1500

REIVINDICACIONES

- 1.- Una cepa de de *Thermoanaerobacter mathranii* seleccionada de BG1 (n.º de registro DSMZ 18280) y sus mutantes, siendo capaces dicha cepa y dichos mutantes de esta de crecer en un medio que comprende un material de biomasa lignocelulósica hidrolizada que tiene un contenido en materia seca de al menos 10% en p/p.
- 5 2.- Una cepa según la reivindicación 1, que es capaz de crecer a 70 °C o por encima de 70 °C.
- 3.- Una cepa según la reivindicación 1, que es capaz de crecer sobre galactosa como única fuente de carbono.
- 4.- Una cepa según la reivindicación 1, que es capaz de producir un producto de la fermentación seleccionado del grupo que consiste en un ácido, un alcohol, una cetona e hidrógeno.
- 10 5.- Una cepa según la reivindicación 1, en la que uno o más genes han sido insertados, deletados o sustancialmente inactivados.
- 6.- Una cepa según la reivindicación 1, en la que un gen que codifica la lactato deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27) ha sido infrarregulado o sustancialmente inactivado.
- 7.- Una cepa según la reivindicación 6, que es BG1L1 (n.º de registro DSMZ 18283).
- 15 8.- Una cepa según la reivindicación 1, en la que un gen que codifica la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (EC 1.2.7.1) ha sido infrarregulado o sustancialmente inactivado.
- 9.- Una cepa según la reivindicación 8, que es BG1PF1 (n.º de registro DSMZ 18282).
- 10.- Una cepa según la reivindicación 1, en la que un gen que codifica una hidrogenasa o una subunidad de hidrogenasa ha sido infrarregulado o sustancialmente inactivado.
- 11.- Una cepa según la reivindicación 10, que es BG1H1 (n.º de registro DSMZ 18281).
- 20 12.- Una cepa según la reivindicación 1, en la que un gen que codifica una acetato quinasa (EC 2.7.2.1) ha sido sustancialmente inactivado mediante la mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en dicho gen.
- 13.- Una cepa según la reivindicación 1, en la que un gen que codifica una fosfato acetiltransferasa (EC 2.3.1.8) ha sido sustancialmente inactivado mediante la mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en dicho gen.
- 25 14.- Una cepa según la reivindicación 1, en la que se han insertado uno o más genes.
- 15.- Una cepa según la reivindicación 1, en la que se han insertado uno o más genes que codifican una polisacarasa.
- 30 16.- Una cepa según la reivindicación 15, en la que la polisacarasa se selecciona del grupo que consiste en celulasas (EC 3.2.1.4); beta-glucanasas, que incluyen glucano 1,3-beta-glucosidasas (exo-1,3-beta-glucanasas, EC 3.2.1.58), 1,4-beta-celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) y endo-1,3(4)-beta-glucanasas (EC 3.2.1.6); xilanasas, que incluyen endo-1,4-beta-xilanasas (EC 3.2.1.8) y xilano 1,4-beta-xilosidasa (EC 3.2.1.37); pectinasas (EC 3.2.1.15); alfa-glucuronidasa, alfa-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), acetilesterasa (EC 3.1.1.-), acetilxilanesterasa (EC 3.1.1.72), alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), beta-amilasa (EC 3.2.1.2), glucoamilasa (EC 3.2.1.3), pululanasa (EC 3.2.1.41), beta-glucanasa (EC 3.2.1.73), hemicelulasa, arabinosidasa, mananasas, que incluyen manano endo-1,4-beta-manosidasa (EC 3.2.1.78) y manano endo-1,6-alfa-manosidasa (EC 3.2.1.101), pectina hidrolasa, poligalacturonasa (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67) y pectato laasa (EC 4.2.2.10).
- 35 17.- Un procedimiento para producir un producto de la fermentación, que comprende cultivar una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1-16 bajo condiciones adecuadas.

Fig. 1

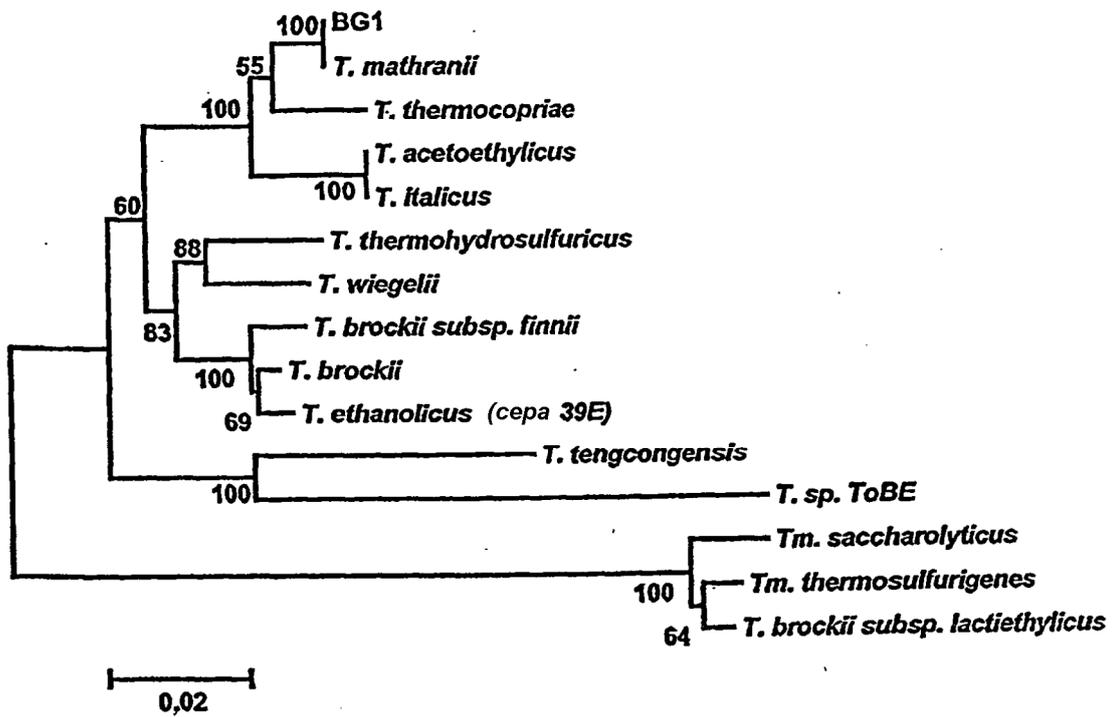


Fig. 2

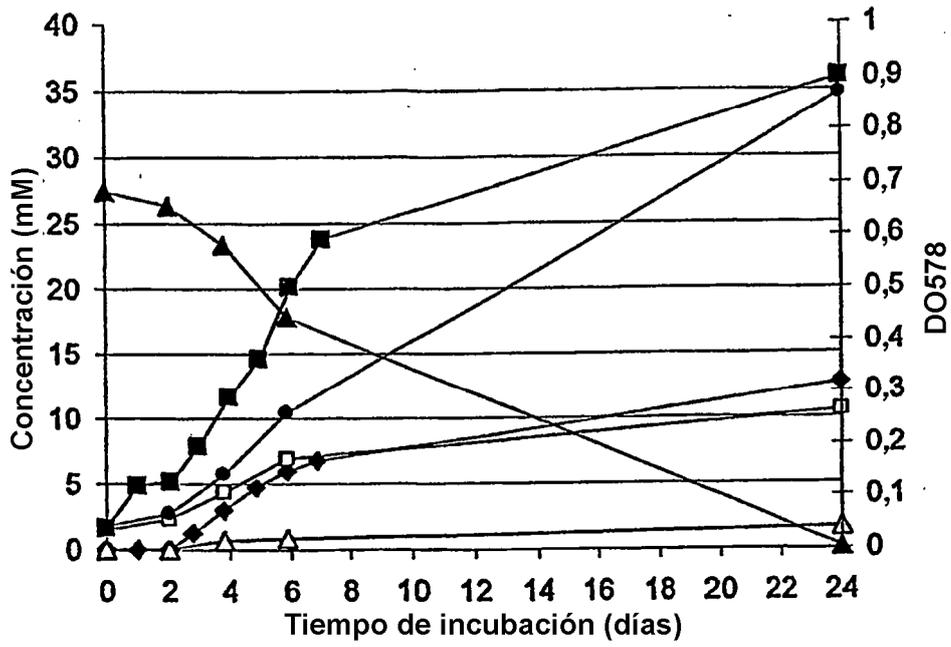


Fig. 3

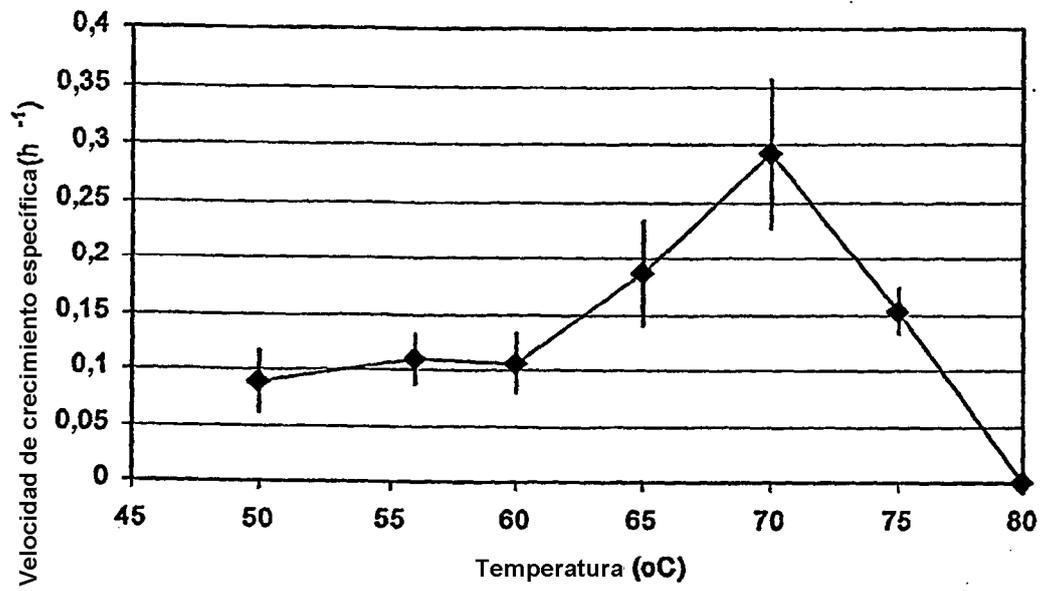


Fig. 4

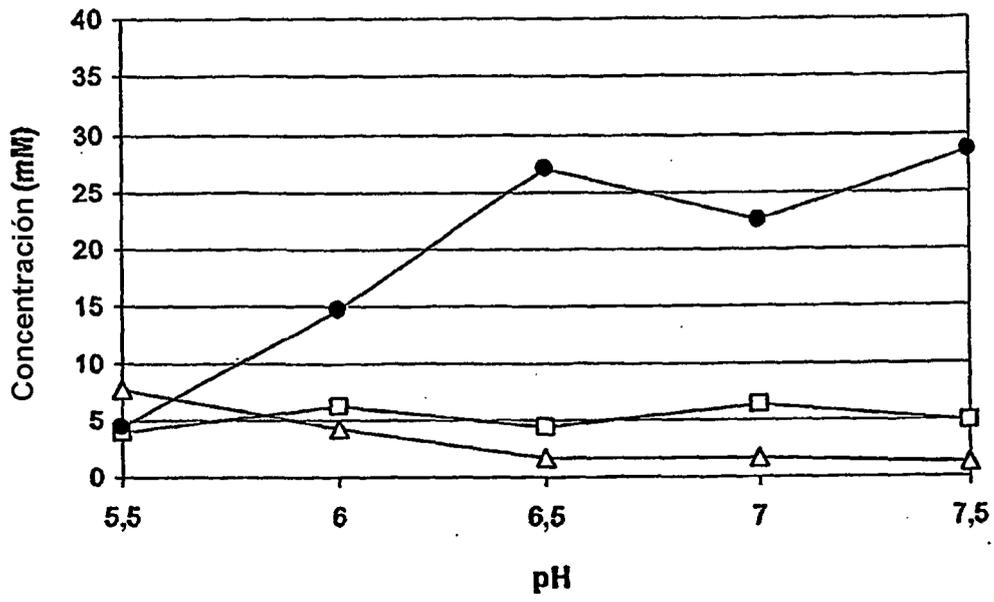


Fig. 5

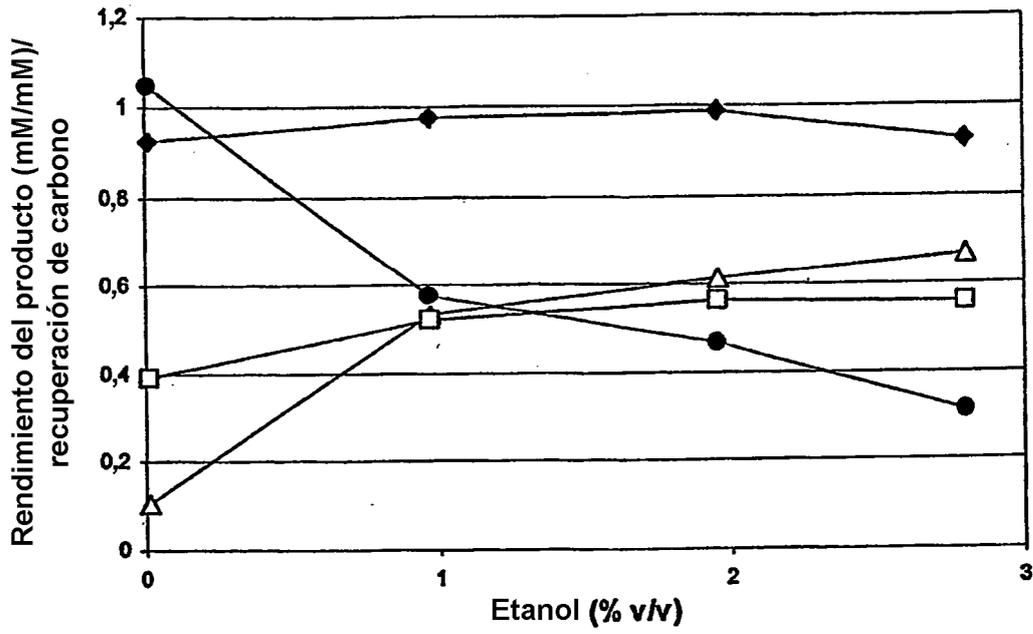


Fig. 6

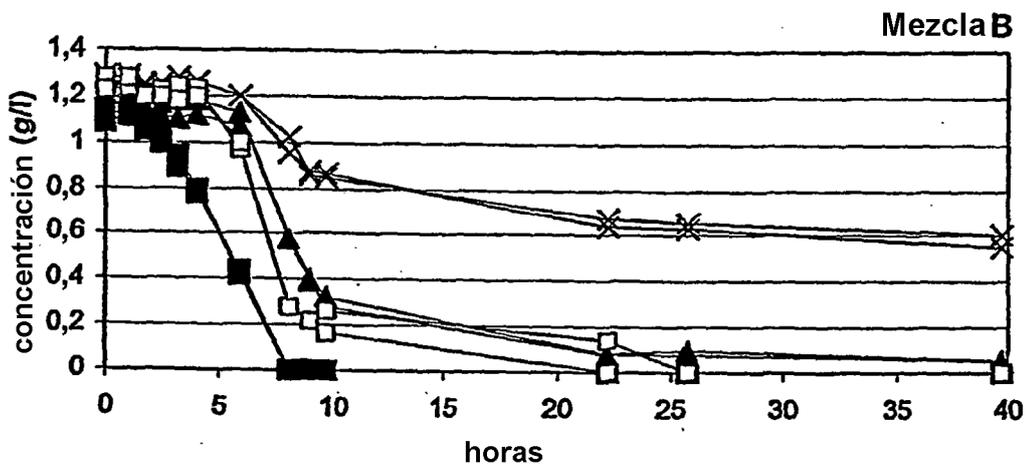
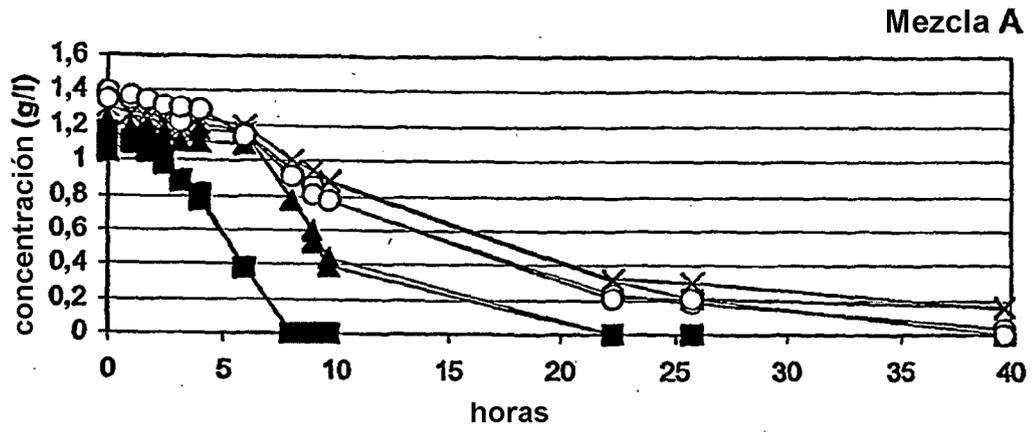
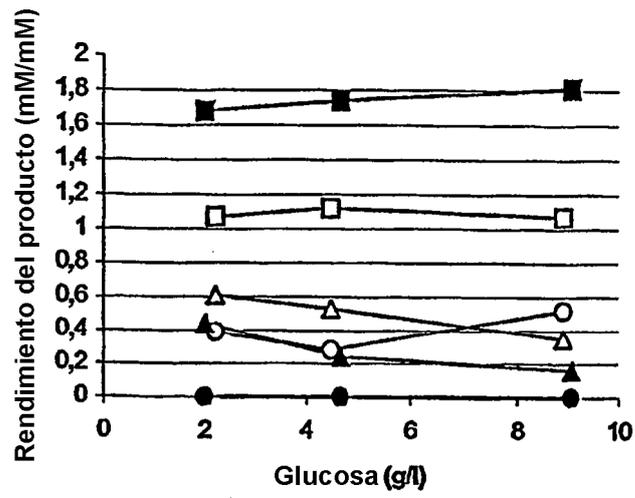


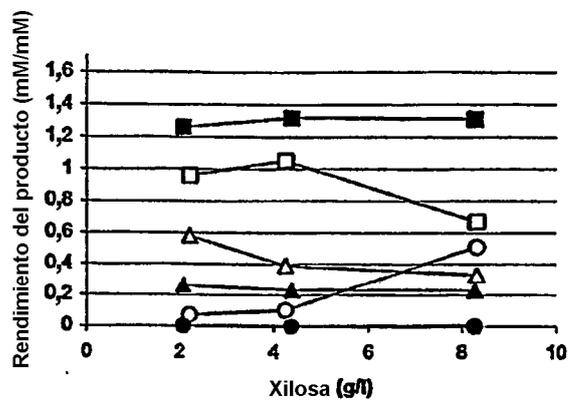
Fig. 7



B

Cepa	BGI			BGIL1		
Glucosa g/l	2,21	4,48	8,89	2,02	4,67	9,06
C rec	1,04	0,97	0,94	1,06	0,99	0,99

A Fig. 8

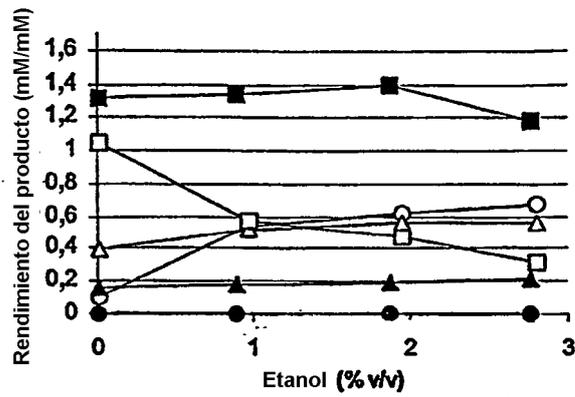


B

Cepa	BG1			BGIL1		
Xilosa g/l	2,21	4,26	8,31	2,09	4,39	8,27
C rec	0,97	0,93	0,91	0,91	0,94	0,94

Fig. 9

A



B

Cepa	BG1				BG1L1			
Etanol %	0,01	0,96	1,95	2,80	0,01	0,90	1,89	2,77
C rec	0,93	0,98	0,99	0,93	0,88	0,91	0,95	0,84

Fig. 10

HRT	Influente		Efluente				CTS	Y _{Acé/TS}	Y _{EIOH/TS}	Y* _{EIOH/TS}	Q _{EIOH}	CR
	Glu	Xil	Glu	Xil	Ace	EtOH						
horas	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	%	g/g	g/g	g/g	g/l/h	%
8	0	10,29	0	0,12	0,34	4,07	98,8	0,03	0,4	0,45	0,51	0,83
8	10,86	9,65	0,02	0,24	1,4	6,43	98,7	0,07	0,31	0,41	0,8	0,73
8	19,29	9,41	2,06	1,76	2,23	7,4	86,7	0,08	0,26	0,34	0,93	0,72
24	20,42	9,77	0	0,09	2,68	10,35	99,7	0,09	0,34	0,40	0,43	0,81
24	25,23	14,64	0,12	0,47	3,19	13,2	98,9	0,08	0,33	0,40	0,55	0,78
24	33,11	21,39	3,37	1,74	4,49	15,35	90,6	0,08	0,28	0,36	0,64	0,74
24	40,55	24,71	14,05	6,38	2,43	10,46	68,7	0,04	0,16	0,28	0,44	0,54

Fig. 11

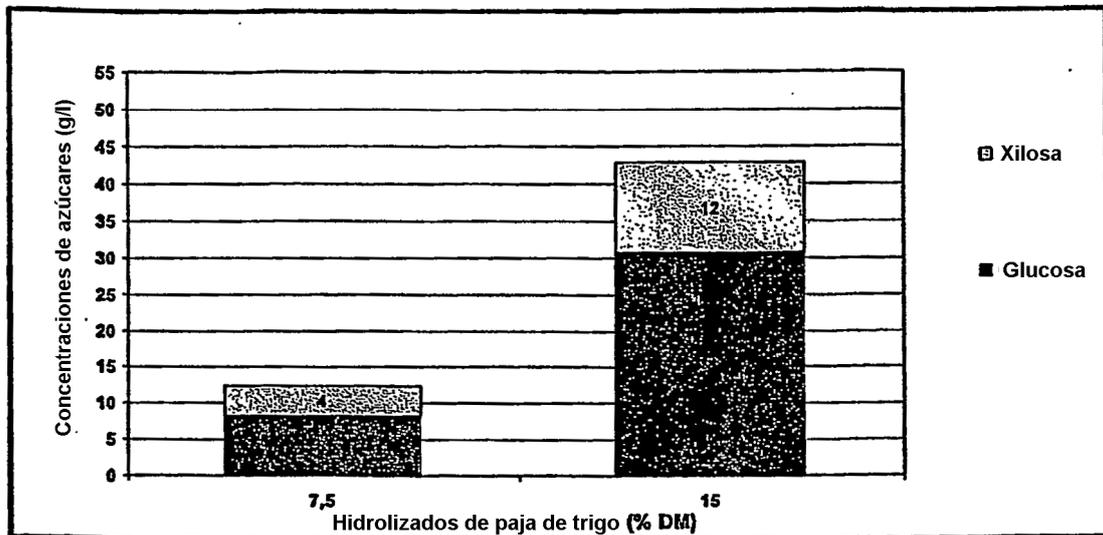


Fig. 12

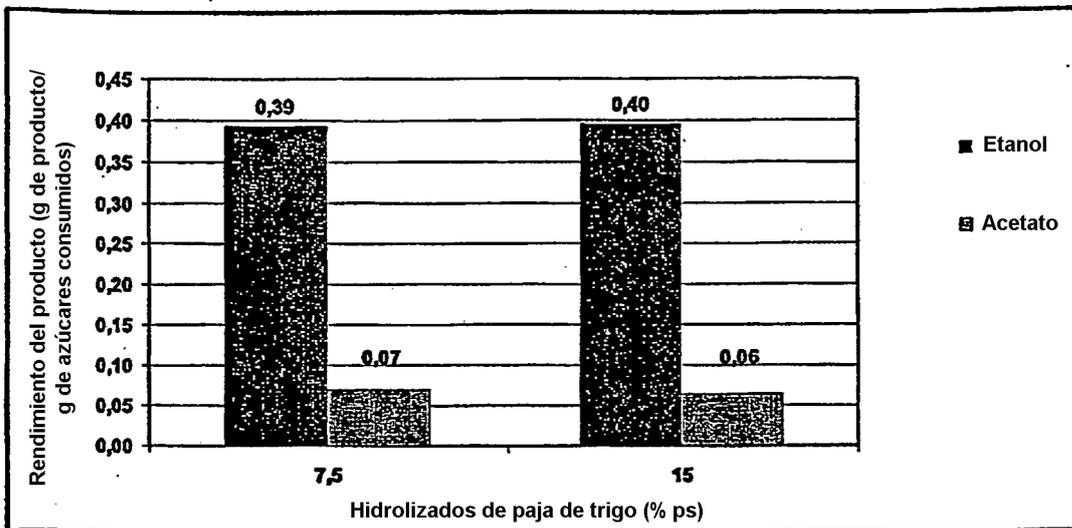


Fig. 13

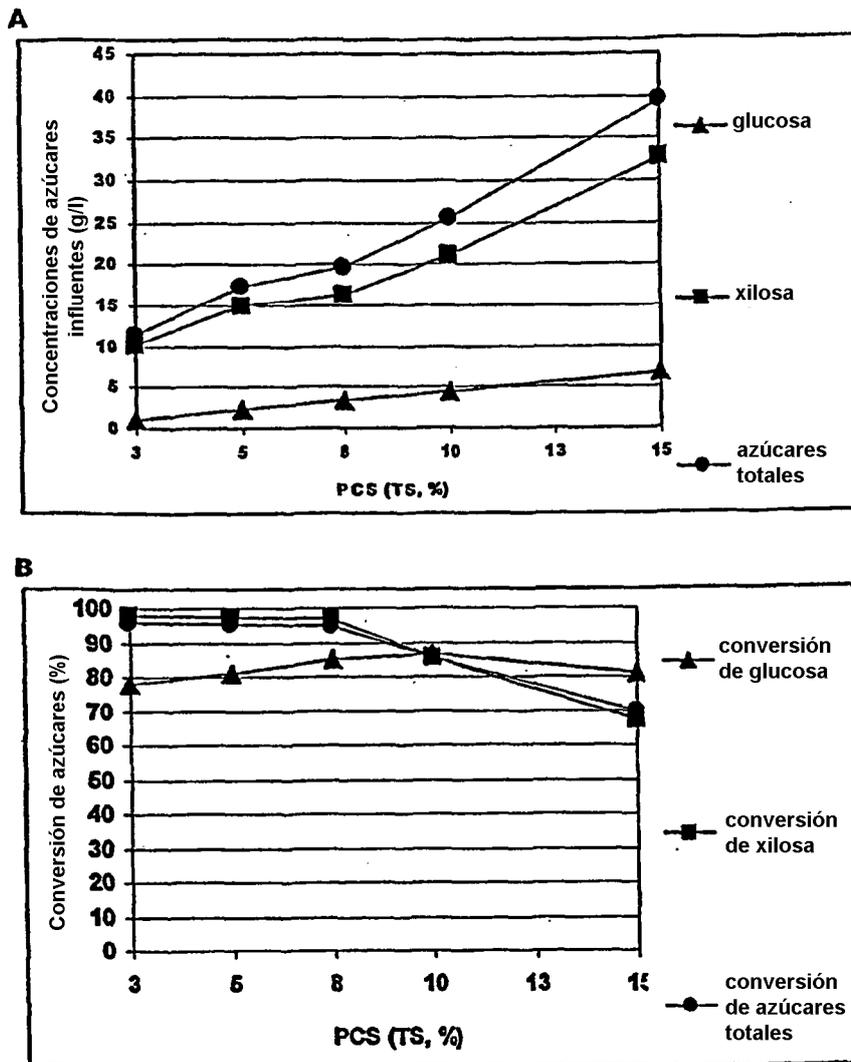


Fig. 14

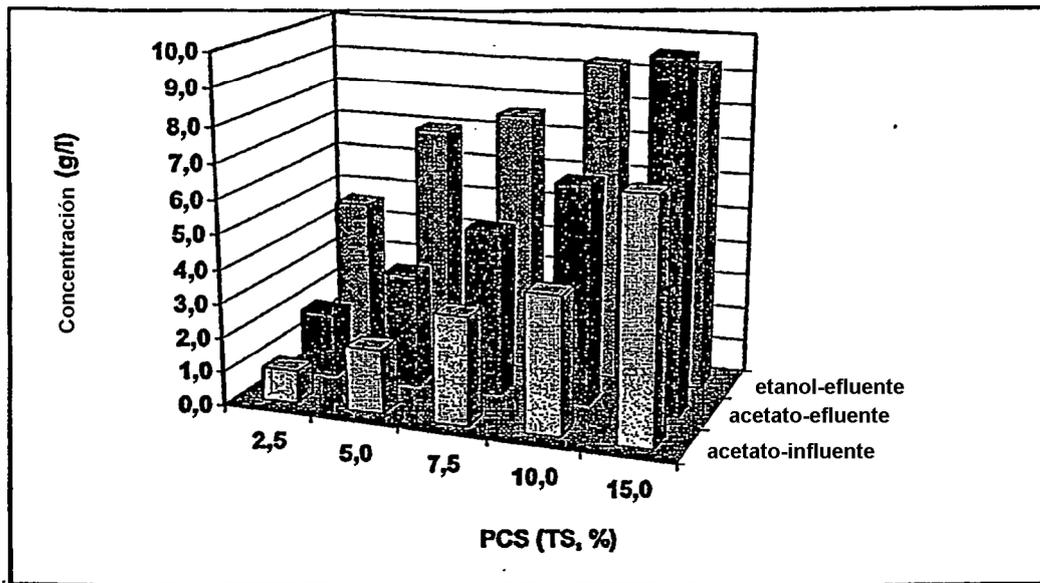


Fig. 15

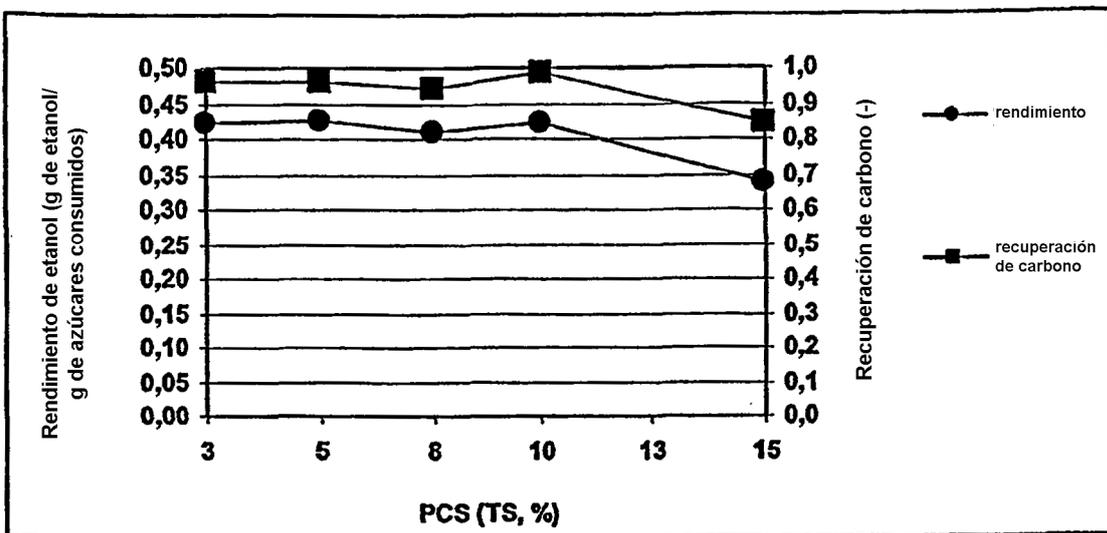


Fig. 16

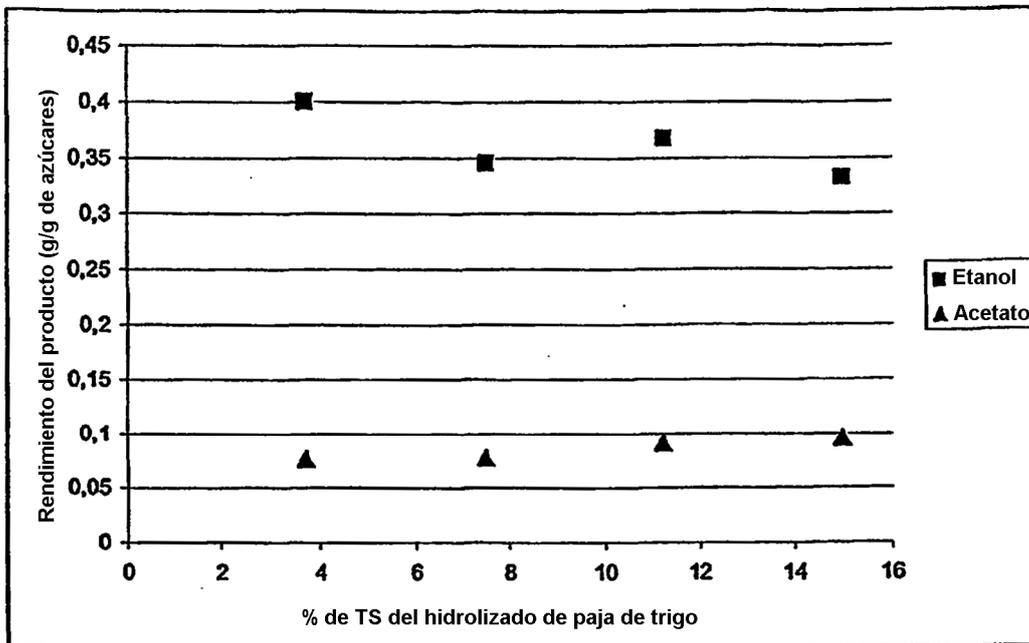


Fig. 17



Fig. 18

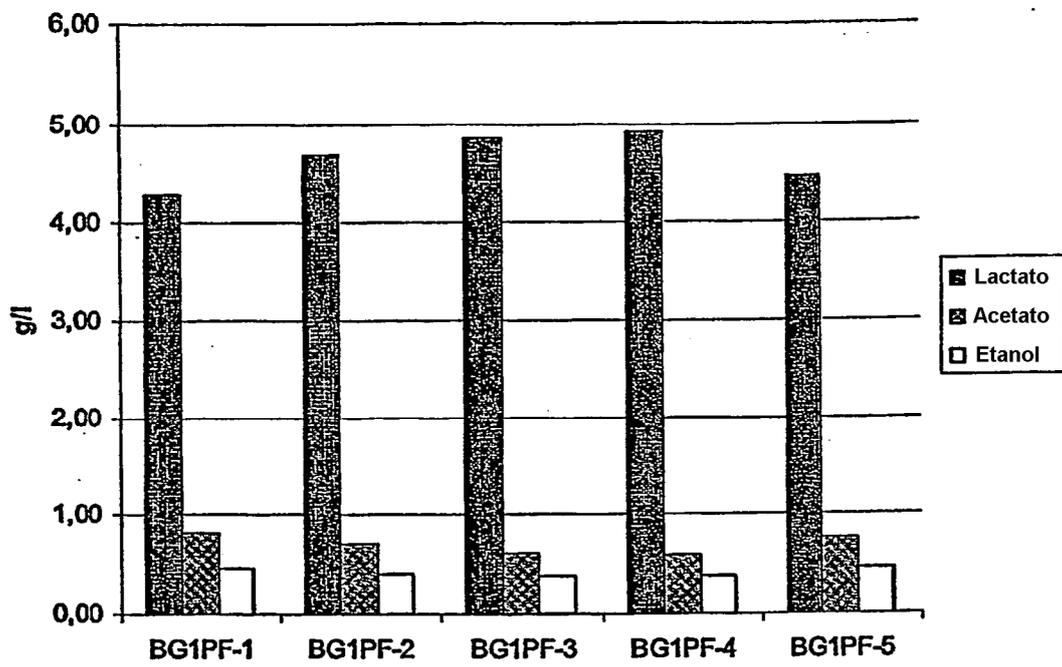


Fig. 19

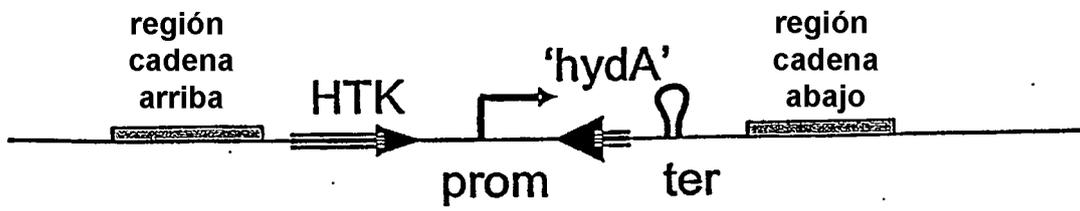


Fig. 20

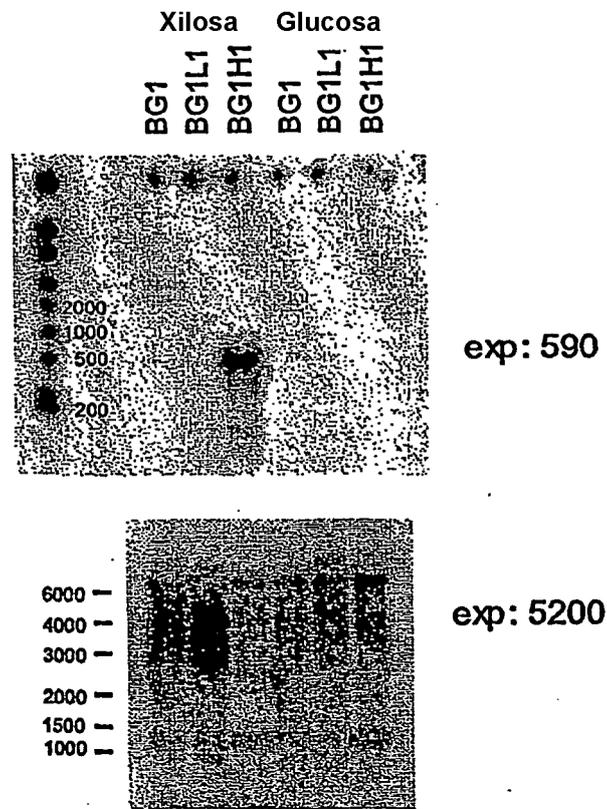


Fig. 21

