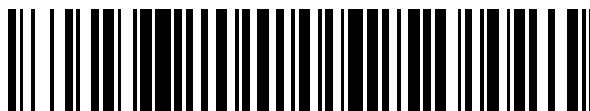


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 254**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/56** (2006.01)

**C12P 7/62** (2006.01)

**C12N 1/16** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2003 E 03756237 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1513939**

54 Título: **Proceso de fermentación usando velocidades de incorporación de oxígeno específicas como un control del proceso**

30 Prioridad:

**30.05.2002 US 384333 P**

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

**18.02.2015**

73 Titular/es:

**CARGILL INC. (100.0%)  
15407 McGinty Road West  
Wayzata, MN 55391 , US**

72 Inventor/es:

**VAN HOEK, PIM;  
ARISTIDOU, ARISTOS y  
RUSH, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 529 254 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Proceso de fermentación usando velocidades de incorporación de oxígeno específicas como un control del proceso

El ácido láctico presenta una amplia aplicabilidad industrial, que incluye usos en la síntesis y el procesamiento químicos, los productos cosméticos, los productos farmacéuticos, los plásticos y la producción de alimentos. La mayoría de los procesos a escala industrial para preparar ácido láctico son procesos de fermentación. En esos procesos de fermentación se han usado diversas bacterias productoras de ácido láctico.

En una reciente investigación se ha estudiado el uso de cepas de levadura recombinantes en procesos de fermentación para ácido láctico. Las levaduras recombinantes pueden proporcionar potencialmente varias ventajas sobre las fermentaciones bacterianas. Algunas cepas de levadura son más resistentes a temperaturas más elevadas. Esto permite potencialmente fermentaciones a mayores temperaturas, lo que se puede traducir en mayores velocidades de las fermentaciones. Una mayor resistencia a temperaturas elevadas puede hacer más sencillo purgar un medio de fermentación de los microbios contaminantes ya que el medio puede ser simplemente calentado a una temperatura a la que mueren las especies indeseadas pero que las especies deseadas pueden tolerar. Bacterias productoras de ácido láctico tales como los lactobacilos requieren un medio de fermentación complejo para poder producir eficazmente. La complejidad del medio de fermentación aumenta los costes de las materias primas y hace más difícil y costoso separar el ácido láctico del medio. El empleo de levaduras recombinantes ofrece la posibilidad de reducir los costes al usar un medio de fermentación simplificado.

Porro y colaboradores han intentado diseñar una levadura productora de ácido láctico insertando un gen LDH (lactato deshidrogenasa) exógeno en células de levadura de las especies *S. cerevisiae*, *K. lactic*, *T. delbrueckii* y *Z. bailii* y alterando la ruta natural del piruvato de las células. Véanse Porro et al., "Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid", *Biotechnol. Prog.*, mayo-junio de 1995, 11 (3): 294-8; Porro et al., "Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts", *App. Environ. Microbiol.*, septiembre de 1999, 65 (9): 4211-5; y Bianchi et al., "Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactic* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene", *App. Environ. Microbiol.*, diciembre de 2001, 67 (12): 5621-5. Porro fue capaz de producir una levadura recombinante que produce ácido láctico, pero las cepas casi no se comportaban lo bastante bien para su implementación en un proceso comercial. Para su calificación para uso en un entorno industrial, la cepa debe generar buenos rendimientos de ácido láctico (es decir, una elevada conversión del sustrato en ácido láctico) y una elevada productividad (es decir, un rápido metabolismo del sustrato a ácido láctico). La levadura es preferiblemente capaz de tolerar un medio que tiene un título elevado de ácido láctico.

Más recientemente, Rajgarhia y colaboradores han creado una levadura recombinante que presenta unos rendimientos y unas productividades mayores que los de Porro. Véanse, por ejemplo, los Documentos WO 00/71738, WO 02/42471 y PCT/US02/16223. El trabajo de Rajgarhia, como se describe en el Documento WO 00/71738, intenta aprovecharse del llamado fenotipo "Crabtree negativo" presentado por ciertas especies de levadura. El efecto Crabtree se define como la aparición de metabolismo fermentativo bajo condiciones aeróbicas a causa de la inhibición del consumo de oxígeno por un microorganismo cuando es cultivado a altas velocidades de crecimiento específicas (efecto de larga duración) o en presencia de glucosa en altas concentraciones (efecto de corta duración). Los fenotipos Crabtree negativos no presentan este efecto y, por lo tanto, son capaces de consumir oxígeno incluso en presencia de glucosa en altas concentraciones o bajo altas velocidades de crecimiento. De este modo, los cultivos de microorganismos Crabtree negativos, al menos en teoría, pueden ser convertidos de una fase de crecimiento en una fase de fermentación (producción) a través de la manipulación del suministro de oxígeno. En presencia de una aireación significativa, los microorganismos crecen para producir biomasa y CO<sub>2</sub>, mientras que, bajo condiciones anaeróbicas, las células fermentan en cambio el sustrato disponible para producir ácido láctico u otros productos de fermentación.

Sin embargo, hemos hallado que ciertas cepas no fermentan tan eficazmente como sería deseable bajo condiciones estrictamente anaeróbicas. Esto es cierto, por ejemplo, en cepas de levadura modificadas en que la ruta de la piruvato descarboxilasa (PDC) está suprimida o alterada. Sin embargo, el uso de tales especies modificadas es por otro lado muy deseable en las fermentaciones lácticas (así como en otras en que el producto deseado no es etanol) ya que la alteración de la ruta de la PDC reduce la cantidad de etanol que se produce. En consecuencia, sería deseable obtener un proceso de fermentación mejorado en que una cepa que no fermenta eficazmente bajo condiciones estrictamente anaeróbicas pudiera producir económicamente un producto de fermentación deseado.

La Figura 1 es un gráfico que ilustra el efecto de la velocidad de incorporación de oxígeno (OUR; del inglés, *oxygen uptake rate*) sobre el consumo de glucosa y sobre la producción y el rendimiento de ácido láctico para cierta especie de *K. marxianus* genéticamente modificada.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra el efecto de la OUR sobre el consumo de glucosa y sobre la producción y el rendimiento de ácido láctico para otra especie de *K. marxianus* genéticamente modificada.

La invención se define en su forma más amplia mediante la Reivindicación independiente 1:

- 5 1. Un proceso de fermentación en donde una levadura genéticamente modificada que tiene una alteración de una ruta nativa de la piruvato descarboxilasa (PDC) fermenta un sustrato de fermentación, se mantiene la concentración de oxígeno disuelto en menos del 1% de la cantidad de saturación y se determina la velocidad de incorporación de oxígeno específica durante una fase de producción del proceso de fermentación, y se controla al menos un parámetro operativo en respuesta a la velocidad de incorporación de oxígeno medida.

En las Reivindicaciones 2-5 dependientes se definen realizaciones preferidas:

2. El proceso de la Reivindicación 1, en donde el parámetro operativo es uno o más seleccionado del grupo que consiste en la velocidad de aireación, la velocidad de agitación y la composición del gas de aireación.
- 10 3. El proceso de la Reivindicación 1, en donde el microorganismo tiene al menos un gen exógeno funcional que permite a la célula producir un producto de fermentación deseado.
4. El proceso de la Reivindicación 3, en donde el gen exógeno es un gen de lactato deshidrogenasa.
5. El proceso de la Reivindicación 4, en donde el microorganismo es del género *Candida* o *Kluyveromyces*.

15 En otro aspecto, se describe un método para llevar a cabo un proceso de fermentación en un medio de fermentación que comprende un microorganismo fermentador y un sustrato que es fermentable por el microorganismo, fermentación que presenta una cantidad de oxígeno disuelto (DO; del inglés, dissolved oxygen) y una incorporación de oxígeno específica (OUR) durante la fermentación, que comprende

- a) medir la OUR durante una fase de producción de una fermentación; y
- 20 b) ajustar las condiciones de aireación para que la OUR se mantenga dentro de un intervalo predeterminado mientras se mantiene el DO en menos del 1% de la cantidad de saturación durante la fase de producción de la fermentación.

En un tercer aspecto, esta descripción se refiere a un proceso que comprende

- a) determinar un intervalo óptimo de valores de OUR en el que un microorganismo fermentador fermenta un carbohidrato hasta un producto de fermentación deseado;
- 25 b) cultivar el microorganismo en un medio que comprende un carbohidrato que la célula es capaz de metabolizar y uno o más nutrientes, mientras se airea el medio de manera que las células crecen y se reproducen, se reduce el DO en el medio a menos del 1% de la cantidad de saturación y las células presentan una velocidad de incorporación de oxígeno específica de al menos 10 milimoles de O<sub>2</sub>/g de peso de células en estado seco/hora (milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h); y luego
- 30 c) cultivar el microorganismo en un medio tamponado bajo unas condiciones de fermentación que incluyen unas condiciones de microaireación suficientes para obtener el cultivo con una velocidad de incorporación de oxígeno (OUR) específica dentro del intervalo óptimo.

En otro aspecto, esta descripción se refiere a un proceso de fermentación que comprende

- 35 a) cultivar células de levadura modificadas que tienen una ruta alterada de la PDC y un gen exógeno que permite a la célula producir un producto de fermentación deseado en un medio que comprende un carbohidrato que la célula es capaz de metabolizar, mientras se airea el medio de manera que las células crecen y se reproducen, se reduce la cantidad de oxígeno disuelto en el medio a menos del 1% de la saturación y las células presentan una velocidad de incorporación de oxígeno específica de al menos 10 milimoles de O<sub>2</sub>/g de peso de células en estado seco/hora (milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h); y luego
- 40 b) cultivar las células en un medio tamponado bajo unas condiciones de fermentación que incluyen unas condiciones de microaireación suficientes para obtener el cultivo con una velocidad de incorporación de oxígeno (OUR) específica de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 3,0 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h.

45 Sorprendentemente, el uso de unas condiciones de microaireación en que se emplean las velocidades de incorporación de oxígeno como un parámetro de control del proceso permite la optimización del proceso de fermentación, equilibrando unos elevados rendimientos relativos al producto de fermentación deseado con unas buenas velocidades de producción. Las mediciones de la OUR pueden ser utilizadas para establecer y controlar ciertos parámetros del proceso de fermentación con objeto de mantener unas condiciones óptimas durante una fase de producción de un proceso de fermentación.

La OUR es la velocidad de consumo de oxígeno ( $O_2$ ) por unidad de peso del microorganismo de producción en estado seco por unidad de tiempo. La OUR se determina convenientemente a partir de la cantidad de oxígeno que se consume por unidad de tiempo y a partir de la masa de las células durante ese periodo de tiempo. El consumo de oxígeno se determina convenientemente midiendo la cantidad de oxígeno suministrado a, y retirado de, el recipiente de fermentación por unidad de tiempo. Luego se determina la OUR dividiendo el consumo de oxígeno por la masa [peso en estado seco ( $dw$ ; del inglés, dry weight)] de la biomasa en el caldo. Se puede determinar el peso de biomasa tomando una muestra y midiendo la concentración de células (peso/volumen) y multiplicando por el volumen total de caldo. La cantidad de oxígeno suministrado puede ser sencillamente medida determinando las velocidades de aireación. La cantidad de oxígeno que sale del recipiente de fermentación puede ser medida usando diversos métodos analíticos, de entre los cuales la espectroscopía de masas es particularmente útil. La diferencia entre oxígeno suministrado y oxígeno retirado es la cantidad consumida por las células. La OUR se calcula dividiendo el consumo de oxígeno por el peso de las células en estado seco y por unidad de tiempo. Se expresa convenientemente en unidades de milimoles de  $O_2$ /gramos de células [peso en estado seco ( $dw$ )]/hora.

En su aspecto más general, la invención acarrea medir la OUR durante la fase de producción de una fermentación y controlar al menos un parámetro de la fermentación en respuesta a los valores de OUR medidos. El parámetro que se controla en respuesta a la OUR medida estará típicamente relacionado con la aireación del caldo de fermentación, tal como velocidades de aireación, velocidades de agitación, composición del gas de aireación (por ejemplo, aumentando o disminuyendo la concentración de oxígeno en el gas) o algún otro parámetro que afecte a la velocidad a la que los microorganismos del caldo consumen oxígeno.

En un aspecto preferido de la invención, las células fermentadoras son cultivadas bajo diversas condiciones de aireación para establecer empíricamente un intervalo óptimo de OUR para el tipo particular de célula. En general, para el intervalo de OUR que es óptimo se tendrán en cuenta diversos factores, de los cuales tres tienden a ser primordiales: el rendimiento del producto de fermentación deseado con respecto al sustrato de fermentación (expresado normalmente en gramos de producto/gramos de sustrato consumidos), la productividad específica del producto de fermentación deseado (expresada normalmente en peso de producto/peso de células en estado seco/unidad de tiempo), y las velocidades de consumo de sustrato (expresadas normalmente en peso de sustrato consumido/unidad de tiempo). No todos estos factores están normalmente optimizados bajo las mismas condiciones de aireación. Por ejemplo, las velocidades de consumo de sustrato aumentan a veces al aumentar la OUR, pero los rendimientos tienden a caer, contrarrestándose por ello las mayores velocidades de producción con unas mayores pérdidas de rendimiento y dañándose la economía global del proceso. El establecimiento de un intervalo óptimo de valores de OUR implicará generalmente equilibrar las velocidades con el rendimiento para optimizar la economía global del proceso. Una vez que se ha establecido un intervalo deseado de valores de OUR, se seleccionan las condiciones de fermentación en una fase de producción de una fermentación para establecer y mantener la OUR dentro de ese intervalo. Como antes, se mide la OUR durante el proceso y se controlan uno o más parámetros de fermentación para que la OUR se mantenga dentro del intervalo.

Durante esta fase de producción, la concentración de oxígeno disuelto se mantiene en aproximadamente cero, lo que refleja el estado en que las células están consumiendo oxígeno a aproximadamente la misma velocidad a la que se está disolviendo en el caldo de fermentación. La concentración de oxígeno disuelto durante la fase de producción es generalmente inferior al 1% de la cantidad de saturación (es decir, la cantidad máxima que se puede disolver en el caldo bajo las condiciones de temperatura y presión que se emplean). Típicamente, son adecuados los contenidos de oxígeno disuelto inferiores a aproximadamente 10 micromoles/l, más preferiblemente inferiores a 5 micromoles/l. Lo más preferiblemente, el contenido de oxígeno disuelto es esencialmente cero. El oxígeno disuelto se mide convenientemente usando un electrodo de oxígeno con una membrana permeable a los gases (electrodo Clark), tal como el fabricado por Ingold y vendido por B Braun bajo los números de artículo 33182418 y 33182400. Se considera que el funcionamiento con contenidos de oxígeno disuelto por debajo del límite de detección de instrumentos tales como estos refleja una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente cero para los propósitos de esta invención.

En un aspecto especialmente preferido de esta invención, se cultiva un microorganismo bajo diferentes condiciones de crecimiento y producción. En la fase de crecimiento el microorganismo se desarrolla aeróbicamente. Las células se desarrollan en un medio que contiene agua, un carbohidrato que la célula puede metabolizar tanto en la fase de crecimiento como en la de producción, y diversos nutrientes como los descritos más adelante con mayor detalle. Las condiciones de aireación se seleccionan de modo que (1) las células presenten una velocidad de incorporación de oxígeno (OUR) específica de al menos 10 milimoles de  $O_2$ /gdw/h y (2) al final de la fase de crecimiento, y la concentración de oxígeno disuelto (DO) en el medio se reduzca a menos del 1% de la cantidad de saturación mientras se mantiene una OUR de al menos 10 milimoles de  $O_2$ /gdw/h. La OUR es preferiblemente al menos 15 y más preferiblemente al menos 18 milimoles de  $O_2$ /gdw/h. Lo más preferiblemente, durante la fase de crecimiento la OUR es lo más elevada que las células puedan generar. Por lo tanto, la OUR máxima dependerá en cierta medida de la particular célula de levadura modificada que se emplee. En general, se espera que la OUR máxima sea aproximadamente 20-30 milimoles de  $O_2$ /gdw/h. Las células de *K. marxianus* que tienen una alteración de la PDC y un gen LDH exógeno tienden a presentar una OUR máxima en el intervalo de aproximadamente 20-22 milimoles de

O<sub>2</sub>/gdw/h.

El DO puede ser, y es preferiblemente, superior a cero durante la mayor parte de la fase de crecimiento con tal de que se reduzca a aproximadamente cero al final de la fase. De este modo, durante la mayor parte de la fase de crecimiento, particularmente durante el periodo en que las células experimentan un crecimiento exponencial, se puede introducir en el medio un exceso de oxígeno con respecto al requerido para mantener la OUR requerida. Puesto que la incorporación total de oxígeno aumenta durante la fase de crecimiento porque las células se reproducen y se acumula biomasa, aumentará la cantidad total de oxígeno requerida para mantener una OUR constante. Sin embargo, puesto que el DO puede ser positivo antes del final de la fase de crecimiento, un modo preferido de llevar la aireación a cabo es suministrar un exceso del oxígeno requerido al inicio y durante la etapa exponencial de la fase de crecimiento. Conforme se acumula biomasa, el oxígeno total consumido por las células aumenta hasta el punto en que el oxígeno suministrado se equipara mucho al consumido por las células, y el DO cae como resultado. Por lo tanto, se pueden usar unas condiciones de aireación constantes durante la fase de crecimiento si esas condiciones se seleccionan de manera que el DO caiga a cero con la OUR requerida cuando se ha producido la cantidad deseada de biomasa. Alternativamente, se pueden variar las condiciones de aireación durante la fase de crecimiento con tal de que la OUR se mantenga y el DO llegue a ser aproximadamente cero al final de la fase de crecimiento.

Una vez que el DO ha caído a aproximadamente cero y se ha producido la cantidad deseada de biomasa, se prefiere mantener aquellas condiciones de aireación (OUR de al menos 10 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h y DO igual a cero) durante un periodo de tiempo antes del cambio a la fase de producción. Un periodo de tiempo adecuado es aproximadamente de 15 minutos a 2 horas, y un periodo de tiempo preferido es aproximadamente de 30 a 90 minutos. Un periodo de tiempo muy preferido es aproximadamente 45-75 minutos. Si se cambia el organismo demasiado rápidamente a la fase de producción, las células tienden a presentar malas velocidades de producción. Si se mantienen estas condiciones de aireación durante demasiado tiempo, las células tienden a presentar malos rendimientos relativos al producto de fermentación deseado así como malas velocidades de producción.

El cultivo se cambia a la fase de producción a través de un cambio en las condiciones de aireación. En la fase de producción, se seleccionan unas condiciones de microaireación para que la OUR se mantenga dentro de un intervalo predeterminado, como se discutió anteriormente. Parece que algunos microorganismos necesitan metabolizar una pequeña cantidad de oxígeno con objeto de promover la vitalidad y la salud celulares globales. Los ejemplos de dichos organismos incluyen levaduras genéticamente modificadas que tienen una alteración de la PDC, particularmente aquéllas que tienen un gen exógeno que las permite producir un producto de fermentación concreto. En condiciones completamente anaeróbicas, las velocidades de consumo de sustrato y de producción del producto de fermentación mostradas por estas células son normalmente muy pequeñas. Además, los rendimientos del producto de fermentación deseado se ven afectados. Bajo condiciones microaeróbicas, con ciertos valores de OUR que dependen de la cepa particular, las células son capaces de metabolizar el sustrato mucho más rápidamente. Esto da lugar a velocidades aumentadas de consumo de sustrato y de producción del producto de fermentación deseado. Sin embargo, cuando el consumo de oxígeno aumenta más allá de cierto valor, los rendimientos relativos al producto deseado disminuyen a medida que más sustrato se convierte en dióxido de carbono. Además, las velocidades de producción tienden a nivelarse o incluso disminuir cuando la OUR aumenta más allá de cierto valor, por lo que las pérdidas de rendimiento no son compensadas por las velocidades aumentadas. En consecuencia, el mantenimiento de la OUR dentro de ciertos intervalos durante la fase de producción permite que se alcance un equilibrio económicamente óptimo entre rendimientos y velocidades de producción.

El valor óptimo de la OUR depende en cierto modo del organismo particular, aunque, en general, el intervalo de OUR es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 3 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h. Los valores de OUR óptimos para un organismo particular son fácilmente determinados empíricamente. Un extremo inferior preferido del intervalo de OUR es aproximadamente 1,0 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h y más preferiblemente aproximadamente 1,2 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h. Un extremo superior preferido del intervalo de OUR es aproximadamente 2,5 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h, más preferiblemente aproximadamente 2,0 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h.

La OUR mostrada por un cultivo depende en gran medida del propio microorganismo y de las condiciones de aireación. Las condiciones de aireación afectan a la cantidad de oxígeno que llega a disolverse en el medio y, por lo tanto, resulta asequible al organismo. Para un organismo dado, se favorece una OUR aumentada (1) incrementando la velocidad a la que se suministra oxígeno y (2) mediante la formación de pequeñas burbujas de oxígeno (para mejorar la transferencia másica de moléculas de oxígeno en la fase líquida). La formación de pequeñas burbujas se alcanza fácilmente por medio de burbujeo y/o agitación.

Los ejemplos de velocidades de aireación durante la fase de crecimiento son aproximadamente al menos 0,2 volúmenes de aire/volumen de medio de fermentación/minuto (vvm), preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 2 vvm, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1 vvm. En la fase de producción son generalmente adecuados los volúmenes de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 vvm, preferiblemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,75 vvm, especialmente de aproximadamente

0,02 a aproximadamente 0,5 vvm. Si se emplea oxígeno como gas de aireación, los volúmenes serán proporcionalmente más pequeños. La aireación se realiza preferiblemente bajo condiciones tales como un burbujeo que provoca la formación de burbujas gaseosas finas. Preferiblemente se mantiene la agitación, particularmente cuando se desean valores de OUR elevados. Típicamente, para alcanzar la OUR deseada se seleccionan conjuntamente las velocidades de aireación y las condiciones de agitación.

Cuando el producto de fermentación es un ácido, el medio es tamponado durante la fase de producción de modo que el pH se mantenga en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0, preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0. Los agentes de tamponamiento adecuados son materiales básicos que neutralizan el ácido láctico conforme se forma, e incluyen, por ejemplo, hidróxido cálcico, carbonato cálcico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato potásico, carbonato sódico, carbonato amónico, amoníaco, hidróxido amónico y similares. En general, también son adecuados en esta memoria aquellos agentes de tamponamiento que han sido utilizados en procesos de fermentación convencionales.

Otras condiciones de fermentación tales como la temperatura, la densidad celular, la selección de sustrato(s), la selección de nutrientes, y similares no se consideran críticas para la invención y se seleccionan generalmente para obtener un proceso económico. Las temperaturas durante cada una de las fases, la de crecimiento y la de producción, pueden variar desde por encima de la temperatura de congelación del medio hasta aproximadamente 50 °C, aunque la temperatura óptima dependerá en cierto modo del microorganismo particular. Una temperatura preferida, particularmente durante la fase de producción, es aproximadamente 30-45 °C. Cuando la célula es una célula de *K. marxianus* modificada, puede tolerar temperaturas relativamente elevadas (tales como por encima de 40 °C y hasta 50 °C, especialmente hasta 45 °C). Otra especie preferida de célula, *C. sonorensis*, puede tolerar temperaturas de hasta aproximadamente 40 °C. Este intervalo de temperaturas proporciona la posibilidad de llevar a cabo la fermentación a tales mayores temperaturas (reduciéndose por ello los costes de refrigeración) sin una pérdida significativa de productividad. Otra ventaja proporcionada por la buena tolerancia a altas temperaturas es que, si se llega a contaminar la fermentación con un microorganismo indeseado, el microorganismo indeseado puede ser selectivamente matado en muchos casos calentando el medio de fermentación a 40 °C o más, especialmente a 45 °C o más, sin dañar significativamente las células deseadas de la invención.

Durante la fase de producción, la concentración de células en el medio de fermentación está típicamente en el intervalo de aproximadamente 1-150, preferiblemente de aproximadamente 3-10, aún más preferiblemente de aproximadamente 3-6, gramos de células en estado seco/litro de medio de fermentación.

Los carbohidratos concretos que se emplean dependen de la célula huésped particular y de si la célula huésped ha sido modificada para que metabolice cualquier carbohidrato concreto hasta piruvato. Se prefieren azúcares hexosas tales como glucosa, fructosa y oligómeros de glucosa tales como maltosa, isomaltosa, maltotriosa, almidón y maltodextrinas. En el caso de azúcares oligoméricos, puede resultar necesario añadir enzimas al caldo de fermentación con objeto de que digieran aquellos hasta el azúcar monomérico. La xilosa es un ejemplo de un azúcar pentosa adecuado. La glucosa es muy preferida.

En una fermentación tamponada, los productos de fermentación ácidos tales como el ácido láctico son neutralizados hasta la correspondiente sal de lactato conforme se forman. Por lo tanto, la recuperación del ácido implica regenerar el ácido libre. Esto se realiza típicamente separando las células y acidulando el caldo de fermentación con un ácido fuerte tal como el ácido sulfúrico. Se forma un subproducto salino (yeso en el caso de que una sal de calcio sea el agente neutralizante y el ácido sulfúrico sea el agente acidulante) que es separado del ácido. Luego se recupera el ácido por medio de técnicas tales como extracción líquido-líquido, destilación, absorción, etc., tal como se describe en T. B. Vickroy, volumen 3, capítulo 38 de Comprehensive Biotechnology (redactado por M. Moo-Young), Pergamon, Oxford, 1985; R. Datta et al., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1995, **16**: 221-231; las Patentes de EE.UU. números 4.275.234, 4.771.001, 5.132.456, 5.420.304, 5.510.526, 5.641.406 y 5.831.122; y la Solicitud de Patente Internacional nº WO 93/00440.

El medio contendrá típicamente nutrientes como los requeridos por la célula particular, incluyendo una fuente de nitrógeno (tal como aminoácidos, proteínas, fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como amoníaco o sales de amonio, y similares) y diversas vitaminas, minerales y similares.

El proceso de la invención puede ser llevado a cabo continua o discontinuamente, o mediante cierta combinación de estas formas.

La levadura que tiene una alteración de una ruta nativa de la PDC, utilizada en el proceso de la invención, es cualquiera que (1) fermenta un carbohidrato hasta un producto de fermentación deseado y (2) fermenta más eficazmente en presencia de condiciones microaeróbicas que en condiciones estrictamente anaeróbicas. Son células de particular interés ciertas células de levadura genéticamente modificadas y caracterizadas por tener (1) una ruta alterada de la PDC y (2) al menos un gen exógeno funcional que permite a la célula producir el producto de fermentación deseado. Dichas células de levadura modificadas adecuadas se describen, por ejemplo, en Porro et

al., "Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid", *Biotechnol. Prog.*, mayo-junio de 1995, 11 (3): 294-8; Porro et al., "Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts", *App. Environ. Microbiol.*, septiembre de 1999, 65 (9): 4211-5; Bianchi et al., "Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene", *App. Environ. Microbiol.*, diciembre de 2001, 67 (12): 5621-5; los documentos WO 00/71738, WO 02/42471 y PCT/US02/16223; y la Solicitud Provisional de EE.UU. n° 60/384.333, presentada el 30 de mayo de 2002. La célula también presenta preferiblemente el fenotipo Crabtree negativo, por lo que respira y crece bajo condiciones de aireación en presencia de altas concentraciones de glucosa y con elevadas velocidades de crecimiento específicas.

10 Por "alterada" se quiere significar que una ruta nativa de la PDC ha sido cambiada para que la función de la ruta de la PDC se reduzca en al menos 90%. La alteración puede ser llevada a cabo cambiando la ruta (o uno o más genes asociados con la ruta) para que su función se reduzca o elimine, o eliminando uno o más genes necesarios para que la ruta funcione. Una célula preferida tiene una delección de un gen PDC.

15 Un gen exógeno preferido es un gen de lactato deshidrogenasa (LDH). El gen se integra preferiblemente en el genoma de la célula. La célula de levadura modificada puede tener una sola copia o múltiples copias del gen LDH exógeno. Puede contener dos o más genes LDH exógenos diferentes. En una realización especialmente preferida, el gen se integra en el genoma de la célula en la posición de un gen PDC nativo, que está suprimido. En la realización especialmente preferida, el gen LDH está bajo el control funcional de secuencias promotoras y terminadoras operativas que tienen una homología de al menos 90% con respecto a secuencias promotoras y terminadoras (particularmente secuencias promotoras y terminadoras de PDC) que son nativas de la célula. Estas células preferidas y especialmente preferidas se describen más detalladamente en la Solicitud Provisional de EE.UU. n° 60/384.333, presentada el 30 de mayo de 2002.

25 *Lactobacillus helveticus*, *Pediococcus acidolactici*, *Lactobacillus casei*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Torulaspota delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe* y *B. megaterium* son cepas que tienen genes de L-lactato deshidrogenasa adecuados que pueden ser clonados para uso en la producción de la levadura modificada. Dos genes de L-lactato deshidrogenasa preferidos son los de L-lactato deshidrogenasa de *L. helveticus* y *B. megaterium*. *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* son cepas que tienen D-lactato deshidrogenasas adecuadas que pueden ser clonadas para uso en la levadura modificada. Un gen de D-lactato deshidrogenasa preferido es el de D-lactato deshidrogenasa de *L. helveticus*.

30 Para que fuera comercialmente útil, la célula modificada debería presentar varias características. La levadura debería convertir una proporción significativa del carbohidrato en el producto de fermentación deseado (es decir, producir el producto con elevado rendimiento). Debería presentar una elevada productividad específica, es decir, producir una gran cantidad de producto de fermentación por peso de célula por unidad de tiempo. Preferiblemente, la célula también es tolerante a elevadas concentraciones del producto de fermentación. Esta última propiedad permite que en el proceso de fermentación se empleen altas concentraciones del carbohidrato de partida.

En general, es deseable que el proceso de fermentación de la invención proporcione algunas de las características siguientes, o todas:

40 A. Un rendimiento de al menos 30, preferiblemente al menos 40, más preferiblemente al menos 60, aún más preferiblemente al menos 75, gramos de producto de fermentación por gramo de sustrato. El rendimiento deseado teórico es 100%, pero los límites prácticos de los rendimientos son aproximadamente 98%.

B. Una productividad específica de al menos 0,1, preferiblemente al menos 0,3, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,4, especialmente al menos aproximadamente 0,5, gramos de producto de fermentación/gramo de células/hora. Las productividades específicas son deseablemente lo más elevadas posibles.

45 C. Un título (concentración máxima de producto de fermentación) de al menos 15 gramos/litro de medio de fermentación, preferiblemente al menos 20 g/l, más preferiblemente al menos 40 g/l, aún más preferiblemente al menos 80 g/l, hasta 150 g/l, preferiblemente hasta aproximadamente 120 g/l. En el caso del ácido láctico, la temperatura del medio de fermentación afecta de algún modo al extremo superior de los títulos fácilmente alcanzables, ya que las disoluciones de ácido láctico muy concentradas (es decir, con más de aproximadamente 150 g/litro) tienden a volverse muy viscosas o a gelificar a temperaturas por debajo de aproximadamente 35 °C. El uso de una mayor temperatura de fermentación, tal como de aproximadamente 35-50 °C, permite títulos mayores sin gelificación ni un excesivo aumento de viscosidad.

55 Además, en el proceso de fermentación de la invención se alcanza preferiblemente una elevada productividad volúmica. La productividad volúmica se expresa como la cantidad de producto producido por unidad de volumen de medio de fermentación por unidad de tiempo, típicamente como gramos de producto/litro de medio/hora. Son deseables unas productividades volúmicas de al menos 1,5 g/l/h, preferiblemente de al menos 2,0 g/l/h, más

preferiblemente de al menos 2,5 g/l/h. Con densidades celulares preferidas de hasta 3-6 g de células/litro de medio de fermentación, las productividades máximas tienden a ser hasta aproximadamente 5,0 g/l/h, y más típicamente hasta aproximadamente 4,0 g/l/h. Es muy preferido llevar la fermentación a cabo de modo que se alcancen estas productividades volúmicas cuando el pH del medio o la temperatura, o ambos parámetros, están dentro de los intervalos descritos en el párrafo precedente.

El ácido láctico producido de acuerdo con la invención es útil para producir lactida, un anhídrido cíclico de dos moléculas de ácido láctico. Dependiendo del estereoisómero del ácido láctico, la lactida puede ser D-lactida (preparada a partir de dos moléculas de ácido D-láctico), L-lactida (preparada a partir de dos moléculas de ácido L-láctico) o D-L-lactida (preparada a partir de una molécula de ácido L-láctico y una molécula de ácido D-láctico). Un método conveniente para producir lactida a partir de ácido láctico es a través de un método de polimerización/despolimerización como el descrito en la Patente de EE.UU. n° 5.142.023, concedida a Gruber et al.

A su vez, la lactida es particularmente útil como un monómero para la producción de polímeros [PLA; del inglés, poly(lactic acid)] y copolímeros de polilactida. En la Patente de EE.UU. n° 5.142.023, concedida a Gruber et al., también se describen procedimientos para preparar estos polímeros. Los productos de PLA preferidos son polímeros estables en estado fundido como los descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.338.822, concedida a Gruber et al. El PLA puede ser semicristalino o amorfo.

Los ejemplos siguientes sirven para ilustrar ciertas realizaciones de la invención y no limitan su alcance ni su espíritu. Todas las partes y porcentajes son en peso a menos que se indique otra cosa.

### Ejemplo 1

Se prepara una reserva madre para inoculación de una célula de levadura modificada, denominada CD 587, en un matraz sacudido de 250 ml de capacidad que contiene 100 ml de medio de extracto de levadura (10 g/l) – peptona (20 g/l) tamponado con CaCO<sub>3</sub> (42 g/l), con 100 g/l de glucosa. A una OD<sub>600</sub> = 10, las células son recolectadas por centrifugación y son posteriormente resuspendidas en una disolución de glicerol al 15% (peso/volumen) y almacenadas a -80 °C en partes alícuotas de 1,5 ml.

La célula CD 587 es una célula de *K. marxianus* que tiene su gen PDC suprimido y un gen D-LDH exógeno de *L. helveticus* integrado en su genoma, en el sitio del gen PDC suprimido, bajo el control de secuencias promotoras y terminadoras de PDC nativas. La célula CD 587 y su preparación se describen más detalladamente en la Solicitud Provisional de EE.UU. n° 60/384.333, presentada el 30 de mayo de 2002.

La fase de crecimiento se inicia inoculando una reserva madre de 1,5 ml en glicerol en un fermentador de 3 l de capacidad, lo que da lugar a una OD<sub>600</sub> inicial de 0,05. La fase de crecimiento se lleva a cabo aeróbicamente burbujeando continuamente aire a un caudal de 1,5 l/min (0,5 vvm), con una velocidad constante del agitador de 800 rpm. Se continúa el crecimiento hasta que el DO se reduce al 5% de la saturación de aire. Esto coincide con una concentración constante de CO<sub>2</sub> en el gas desprendido. Se mide la OUR determinando la cantidad de aire suministrado y analizando el oxígeno de los gases desprendidos por medio de espectrometría de masas. Durante la fase de crecimiento, la OUR es aproximadamente 20,8 ± 2,5 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h. Bajo estas condiciones, la OUR viene limitada por la capacidad de la célula para metabolizar el oxígeno disponible. La densidad celular final es aproximadamente 4 g/l.

Una vez que el DO ha alcanzado el valor de cero, se mantienen las condiciones de aireación durante una hora antes de comenzar la fase de producción. La fase de producción se inicia cambiando instantáneamente el caudal de aire a 0,1 l/min (0,033 vvm) y disminuyendo la velocidad del agitador a 500 rpm. Este cambio en las condiciones de aireación da lugar a una OUR de 1,5 ± 0,1 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h y un DO de cero durante la fase de producción. Se continúa la fermentación durante aproximadamente 60 horas. Se miden la velocidad de consumo de glucosa, la velocidad de producción de lactato y el rendimiento a lactato extrayendo periódicamente muestras para análisis por HPLC/IC/GC-MS. En la Tabla 1 se muestran los resultados en la fase de producción.

Tabla 1

Título máximo de ácido láctico	106 ± 3,1 g/kg
Velocidad de consumo de glucosa	1,2 ± 0,05 g/gdw/h
Velocidad de producción de ácido láctico	1,1 ± 0,04 g/gdw/h
Rendimiento a ácido láctico (fase de producción)	0,92 ± 0,03 g de ácido láctico/g de glucosa
% de carbono recuperado (fase de producción)	99% ± 3,0
Pureza óptica del ácido láctico	> 99,9



Este experimento se repite varias veces variando las condiciones de aireación en la fase de producción con objeto de obtener valores de OUR de aproximadamente 1,2, 2,2, 2,8, 3,0 y 3,2 en ensayos sucesivos. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 1. Como se muestra en la Figura 1, el rendimiento (curva 1) disminuye continua y drásticamente al aumentar la OUR a través del intervalo de 1,2 a 3,0, viéndose un aumento (posiblemente una anomalía) antes de otra disminución significativa a una OUR de 3,2. Estos rendimientos disminuidos son consistentes con una respiración celular aumentada conforme se dispone de cada vez más oxígeno. Las velocidades de producción de lactato (curva 3) aumentan ligeramente dentro de un intervalo de OUR de 1,2 a aproximadamente 2,2 y luego caen cuando se aumenta la OUR a 2,8 antes de aumentar. Sin embargo, el beneficio de unas velocidades de producción aumentadas a valores de OUR de 3 o más se pierde a causa de la creciente pérdida de rendimiento. Las velocidades de utilización de glucosa (curva 2) aumentan algo conforme la OUR aumenta de 1,2 a 2,8 y aumentan sustancialmente a una OUR superior a 3,0 a causa de una rápida respiración celular. Los datos de la Figura 2 sugieren que, para esta cepa, un valor de OUR óptimo está en el intervalo de aproximadamente 0,8 a 2,2, y especialmente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,5.

### Ejemplo 2

Se repite el Ejemplo 1 varias veces utilizando una cepa denominada CD 558. La cepa CD 558 es una célula de *K. marxianus* que tiene suprimido su gen PDC. Contiene un gen D-LDH exógeno de *L. helveticus* aleatoriamente integrado en su genoma. El gen LDH está bajo el control de un promotor PGK-1 de *S. cerevisiae* y secuencias terminadoras Gal-10 de *S. cerevisiae*. En cada ensayo, la OUR es aproximadamente 20,5 milimoles de  $O_2$ /gdw/h en la fase de crecimiento. Las condiciones de aireación durante las fases de producción son variadas de ensayo a ensayo controlando las velocidades de burbujeo y agitación, con objeto de variar la OUR. Los valores de OUR para los diferentes ensayos son aproximadamente 0,6, 1,4, 1,7 y 2,2. Para una OUR de 1,7 en la fase de producción, los resultados son como se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2

Título máximo de ácido láctico	111 g/kg
Velocidad de consumo de glucosa	0,94 g/gdw/h
Velocidad de producción de ácido láctico	0,83 g/gdw/h
Rendimiento a ácido láctico (fase de producción)	0,89 g de ácido láctico/g de glucosa
% de carbono recuperado (fase de producción)	95,6
Pureza óptica del ácido láctico	> 99,9

La Figura 2 ilustra cómo la variación de OUR afecta a las velocidades de producción y los rendimientos. Para esta cepa, el rendimiento a ácido láctico (curva 1) presenta una dependencia muy acusada de la OUR en el intervalo de 0,7 a 2,2, alcanzando un máximo cuando la OUR es alrededor de 1,4. Las velocidades de producción de lactato (curva 3) alcanzan similarmente el máximo a ese valor de OUR. Las velocidades de consumo de glucosa (curva 2) aumentan hasta que la OUR es aproximadamente 2,2 y luego se nivelan. Para esta cepa, los datos de la Figura 2 sugieren que la OUR óptima está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,7, especialmente en el intervalo de aproximadamente 1,2-1,5.

### Ejemplo 3

Se repite tres veces el Ejemplo 1. El primero de estos ensayos (3A) se lleva a cabo del modo descrito en el Ejemplo 1 con la excepción de que la OUR durante la fase de producción es 2,1 milimoles de  $O_2$ /gdw/h. Durante el segundo de estos ensayos (3B), se cambia inmediatamente el cultivo a la fase de producción cuando el DO durante la fase de crecimiento alcanza un valor de cero. La OUR es 1,8 milimoles de  $O_2$ /gdw/h bajo las mismas condiciones de aireación que en el Ejemplo 3A. En el tercer ensayo (3C), se continúa la aireación al final de la fase de crecimiento durante más de 1,5 horas una vez que el DO ha alcanzado un valor de cero, y la OUR en la fase de producción es 1,4 milimoles de  $O_2$ /gdw/h bajo las mismas condiciones de aireación que en el Ejemplo 3A. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Propiedad	Número de ejemplo		
	3A	3B	3C
Tiempo de permanencia, DO de cero	1 h	0	> 1,5 h
OUR, fase de producción (milimoles/gdw/h)	2,1	1,8	1,4

Título máximo de ácido láctico (g/kg)	112,3	84	94
Velocidad de consumo de glucosa (g/gdw/h)	1,22	1,06	0,40
Velocidad de producción de lactato (g/gdw/h)	1,20	0,93	0,32
Rendimiento a ácido láctico (fase de producción, g/g)	0,89	0,84	0,79
% de recuperación de carbono (fase de producción)	105	104,3	98
Pureza óptica (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9

5 Bajo las condiciones de aireación dadas durante la producción, la OUR es un indicador de la actividad metabólica del microorganismo. La disminución de la OUR cuando el tiempo de permanencia es cero o excede de 1,5 horas (con respecto a aquella después de un periodo de permanencia de 1 hora) indica que el microorganismo actúa menos bien bajo esas condiciones. Esto se ve también reflejado en una disminución del consumo de glucosa, la producción de lactato y los rendimientos.

#### Ejemplo 4

10 Se cultiva aeróbicamente una reserva madre para inoculación de una célula de levadura CD 587 en un biorreactor de laboratorio de 14 litros de capacidad usando un medio mineral tamponado (pH de 5,5) y complementado con 160 g/l de glucosa. Se suministra aireación burbujeando aire con agitación a un caudal de 5 litros/minuto. El DO durante esta fase de crecimiento inicial es inicialmente 100% y disminuye a 20% durante el ciclo. La OUR se mantiene a aproximadamente 20 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h. Cuando la OD<sub>600</sub> = 10, se transfieren 4 litros del caldo a un fermentador a escala de producción, de 240 litros de capacidad, que contiene 220 litros adicionales del medio de crecimiento complementado con 170 g/l de glucosa. Las células son adicionalmente cultivadas bajo condiciones aeróbicas a una temperatura de 42 °C y un pH de 5,5 durante aproximadamente 8 horas. Durante este tiempo el DO se reduce de un valor de partida de 100 hasta cero. Se mantiene la OUR a 20 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h mediante aireación con 15 litros/minuto de aire. Se mantiene el cultivo con un DO de cero durante una hora. Luego se cambia el cultivo a la fase de producción reduciendo la aireación para alcanzar una OUR de 1,5-1,7 milimoles de O<sub>2</sub>/gdw/h. Se añade agente de tamponamiento adicional [Ca(OH)<sub>2</sub>] según sea necesario para mantener el pH en 5,5 ± 0,1. El DO permanece en 0% durante la fase de producción. La glucosa se consume en un periodo de 30 horas, lo que proporciona un título de lactato de 114 g/kg. La velocidad específica media de consumo de glucosa durante la fase de producción es 1,1 g/gdw/h. La velocidad específica media de producción de ácido láctico es 0,8 g/gdw/h, con un rendimiento de producción de 0,76 g de ácido láctico/g de glucosa y un rendimiento global (incluyendo la fase de crecimiento) de 0,67 g de ácido láctico/g de glucosa.

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso de fermentación en donde una levadura genéticamente modificada que tiene una alteración de una ruta nativa de la piruvato descarboxilasa (PDC) fermenta un sustrato de fermentación, se mantiene la concentración de oxígeno disuelto en menos del 1% de la cantidad de saturación y se determina la velocidad de incorporación de oxígeno específica durante una fase de producción del proceso de fermentación, y se controla al menos un parámetro operativo en respuesta a la velocidad de incorporación de oxígeno medida.
2. El proceso de la Reivindicación 1, en donde el parámetro operativo es uno o más seleccionado del grupo que consiste en la velocidad de aireación, la velocidad de agitación y la composición del gas de aireación.
- 10 3. El proceso de la Reivindicación 1, en donde la levadura tiene al menos un gen exógeno funcional que permite a la célula producir un producto de fermentación deseado.
4. El proceso de la Reivindicación 3, en donde el gen exógeno es un gen de lactato deshidrogenasa.
5. El proceso de la Reivindicación 4, en donde la levadura es del género *Candida* o *Kluyveromyces*.

FIG. 1

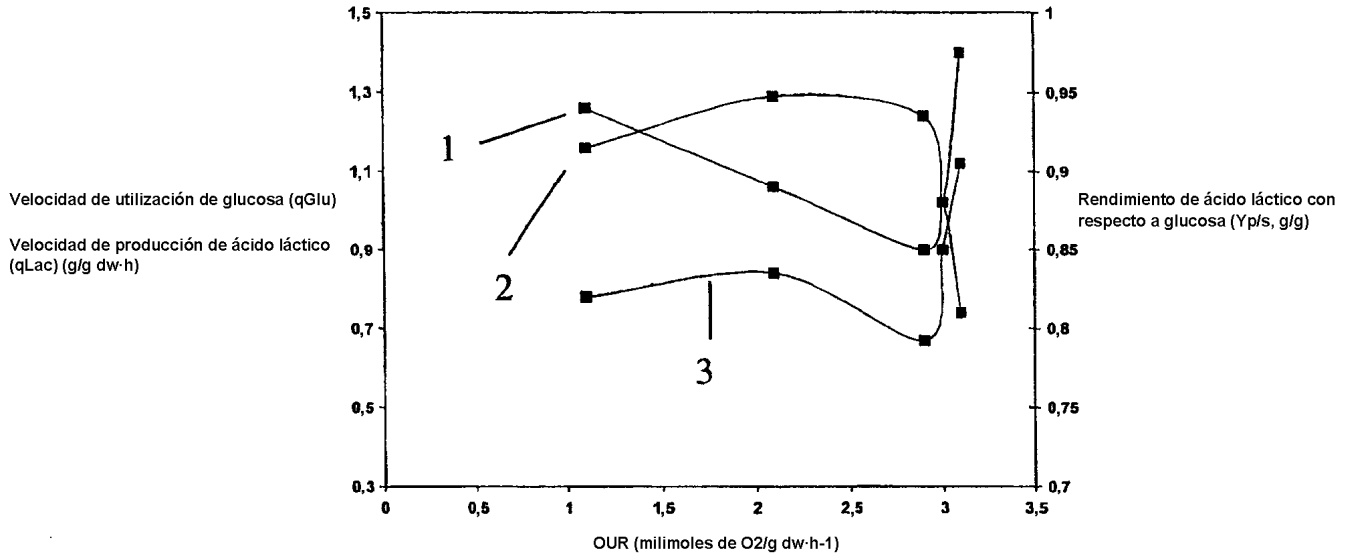


FIG. 2

