

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 443**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/22** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2009 PCT/US2009/068902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10075241**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009 E 09803958 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2376623**

54 Título: **Zymomonas con utilización mejorada de xilosa en condiciones de estrés para la producción de etanol**

30 Prioridad:

**22.12.2008 US 139852 P**

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

**18.01.2017**

73 Titular/es:

**ALLIANCE FOR SUSTAINABLE ENERGY, LLC  
(50.0%)  
1617 Cole Blvd.  
Golden, CO 80401 y  
E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**CAIMI, PERRY, G.;  
EMPTAGE, MARK;  
LI, XU;  
VIITANEN, PAUL, V.;  
CHOU, YAT-CHEN;  
FRANDEN, MARY ANN y  
ZHANG, MIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 597 443 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

*Zymomonas* con utilización mejorada de xilosa en condiciones de estrés para la producción de etanol

**Declaración de derechos del gobierno**

5 Esta invención se realizó con ayuda del Gobierno de Estados Unidos bajo el Contrato No. 04-03-CA-70224 otorgado por el Departamento de Energía y el Contrato No. DE-AC36-08GO28308 entre el Departamento de Energía de Estados Unidos y la Alianza para la Energía Sostenible, LLC, el Administrador y Operador del Laboratorio Nacional de Energías Renovables. El Gobierno de EE. UU. tiene ciertos derechos en esta invención.

**Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere a los campos de la microbiología y fermentación. Más concretamente, se describe el desarrollo de cepas de *Zymomonas* con mejor utilización de xilosa en condiciones de fermentación con estrés.

**Antecedentes de la invención**

15 La producción de etanol por microorganismos proporciona una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles y por tanto es un área importante de la investigación actual. Es deseable que los microorganismos que producen etanol, así como otros productos útiles, sean capaces de utilizar la xilosa como una fuente de carbono puesto que la xilosa es la principal pentosa en materiales lignocelulósicos hidrolizados y por tanto puede proporcionar un sustrato de carbono disponible en abundancia, de bajo costo. *Zymomonas mobilis* y otras bacterias productoras de etanol que no utilizan de modo natural la xilosa se pueden modificar genéticamente para la utilización de xilosa por introducción de genes que codifican 1) xilosa isomerasa, que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa; 2) xiluloquinasa, que fosforila la xilulosa para formar xilulosa-5-fosfato; 3) transcetolasa; y 4) transaldolasa.

20 Ha habido éxito en la ingeniería de células *Z. mobilis* para el metabolismo de la xilosa (documentos US 5514583, US 5712133, US 6566107, WO 95/28476, Feldmann et al. (1992) Appl Microbiol Biotechnol 38: 354-361, Zhang et al. (1995) Science 267:240-243), así como de una cepa de *Zymobacter palmae* (Yanase et al. (2007) Appl. Environ. Microbiol. 73:2592-2599). Sin embargo, por lo general las cepas modificadas no crecen y producen etanol tanto en xilosa como en glucosa. Cepas modificadas para la utilización de xilosa se han adaptado por pasos seriados en medio xilosa, dando por resultado cepas con mejor utilización de xilosa como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 20030162271 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente y de propiedad común, No. US 2008-0286870 A1. Se ha demostrado que estas mejoras son el resultado de la selección para secuencias alteradas para la expresión mejorada del promotor pGAP que regula la expresión del gen de la xilosa isomerasa. Esas secuencias y métodos para su uso en la expresión mejorada de transgenes en *Z. mobilis* se describen en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente y de propiedad común, Nos. US2009-0246876 A1 y US2009-0246846 A1.

35 Se desea usar hidrolizados celulósicos como una fuente renovable de azúcares para medios de fermentación para la producción de etanol por biocatalizadores. Los hidrolizados celulósicos, que se producen generalmente a partir de biomasa por pretratamiento y sacarificación, contienen normalmente sustancias que son perjudiciales para el crecimiento de biocatalizadores y producción. Por ejemplo, el acetato es un producto común presente en hidrolizados celulósicos que se ha demostrado ser inhibidor de *Z. mobilis* a concentraciones encontradas habitualmente en hidrolizado (Ranatunga et al. (1997) Applied Biochemistry and Biotechnology 67:185-198).

40 Sigue habiendo una necesidad de cepas de *Zymomonas*, y de otras bacterias productoras de etanol, que han maximizado la utilización de xilosa en presencia de estrés impuesto por fuentes de azúcares impuros producidas mediante sacarificación de la biomasa.

**Compendio de la invención**

La invención proporciona un método para obtener cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa que han mejorado la utilización de xilosa en condiciones de fermentación con estrés.

45 En consecuencia, la invención proporciona un método para producir una cepa de *Zymomonas* de utilización mejorada de xilosa, que comprende:

- a) proporcionar una o más células de *Zymomonas* que utilizan xilosa;
- b) crecimiento continuo de las células de *Zymomonas* que utilizan xilosa de
  - (a) en un medio de cultivo de alimentación que comprende xilosa, con lo cual se produce un cultivo que comprende etanol;
- 50 c) añadir al cultivo de (b) una cantidad de amoníaco y ácido acético o acetato amónico con lo cual se produce un cultivo con estrés que comprende etanol y acetato amónico y en donde dicha adición da por resultado una concentración de acetato amónico de al menos 24 mM;

d) crecimiento continuo del cultivo con estrés de (c) a través del cual se producen células de *Zymomonas* mejoradas que utilizan xilosa; y

5 e) aislar una o más células del cultivo de (d) en donde al menos una o más células aisladas presentan mejor utilización de xilosa en presencia de acetato amónico y etanol en comparación con las células de *Zymomonas* proporcionadas de (a) que utilizan xilosa, y hacer crecer la célula mejorada como una cepa.

Usando los métodos descritos en esta memoria se pueden obtener células y cepas de *Zymomonas* mejoradas que utilizan xilosa.

10 En un método una cepa de *Zymomonas* que utiliza xilosa adaptada a fermentación en condiciones de estrés puede usar al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, ó 70% de la xilosa disponible en un medio de azúcares mixtos, por ejemplo un medio que contiene 60 g/L de xilosa, 80 g/L de glucosa, 9,54 g/L de acetato, con pH ajustado a 5,8, cuando se parte de una densidad celular de 0,1 de DO a 600 nm, y en condiciones en las que la correspondiente cepa no adaptada utiliza aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, o hasta aproximadamente 30% de la xilosa disponible.

Un método para producir etanol puede comprender:

- 15 a) proporcionar una cepa mejorada de *Zymomonas* que utiliza xilosa, adaptada a fermentación con estrés;
- b) poner en contacto la cepa de a) con un medio de fermentación en condiciones de fermentación adecuadas en las que se produce etanol; y
- c) opcionalmente, aislar el etanol.

20 Las células o cepas adaptadas a fermentación con estrés pueden ser proporcionadas por los procedimientos de adaptación de esta memoria, específicamente con referencia a la adaptación al medio que comprende etanol y acetato amónico.

### Descripción detallada de la invención

25 La presente invención describe un método para producir y aislar células de *Zymomonas* (cultivadas para ser cepas) que han mejorado la utilización de xilosa en condiciones de fermentación con estrés. Las células de *Zymomonas* a las que se aplica el método son células que utilizan xilosa, que, según la invención, se cultivan continuamente en condiciones de estrés de acetato amónico y etanol para producir cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa adaptadas a fermentación con estrés. También se describen cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa adaptadas a fermentación con estrés que se aíslan usando el presente método, y que presentan mejor utilización de xilosa de entrada en condiciones de fermentación con estrés en comparación con las células de la misma cepa antes del proceso de cultivo continuo. Las cepas adaptadas a fermentación con estrés se pueden usar en un procedimiento para producir etanol mediante fermentación de azúcares. El etanol producido por las presentes cepas de *Zymomonas* adaptadas a fermentación con estrés se puede usar como una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles.

30

35 Las siguientes abreviaturas y definiciones se utilizan para la interpretación de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

40 Como se usan en esta memoria, las expresiones “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, “que tiene”, “contiene” o “que contiene” o cualquiera otra variante de las mismas, se destinan a cubrir una inclusión no exclusiva. Por ejemplo, una composición, una mezcla, procedimiento, método, artículo, o aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente solo a esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicha composición, mezcla, procedimiento, método, artículo, o aparato. Además, salvo que se indique expresamente lo contrario, “o” se refiere a una o inclusiva y no a una o exclusiva. Por ejemplo, una condición A o B se satisface por cualquiera de las siguientes: A es verdadero (o presente) y B es falso (o no presente). A es falso (o no presente) y B es verdadero (o presente), y tanto A como B son verdaderos (o presentes).

45 También, los artículos indefinidos “un” y “una” precediendo a un elemento o componente de la invención se destinan a ser no restrictivos en relación con el número de casos (es decir, sucesos) del elemento o componente. Por tanto, “un” o “una” se debe leer para incluir uno o al menos uno, y la forma de la palabra singular del elemento o componente incluye también el plural a menos que el número se entienda obviamente que es singular.

50 Como se usa en esta memoria, “crecimiento continuo” se refiere al cultivo con entrada de nuevo medio y flujo de salida de efluente de manera que las células pueden seguir creciendo y producir el producto.

Como se usa en esta memoria, “cultivo con estrés” se refiere a un cultivo que incluye sustancias en el medio que causan estrés al biocatalizador usado en el cultivo. El estrés de un biocatalizador puede ser reconocido como velocidad de crecimiento reducida, menor producción de producto, utilización reducida de carbohidratos, u otra dificultad en comparación con la función de un biocatalizador usado en fermentación sin las sustancias que causan

estrés. De particular interés son los agentes estresantes para cepas de *Zymomonas* que afectan a la utilización de azúcares para la producción de etanol. Tales agentes estresantes incluyen la presencia de acetato, amoníaco, y etanol. De interés adicional es el efecto que tales agentes estresantes tienen sobre la utilización de xilosa para la producción de etanol.

- 5 Como se usa en esta memoria, "célula(s) *Zymomonas* que utiliza(n) xilosa" se refiere a una célula o células de una cepa que se modifican genéticamente para expresar enzimas que dan la capacidad para utilizar xilosa como una fuente de carbohidratos para fermentación.

10 Como se usa en esta memoria, "cepa correspondiente no adaptada" se refiere a la cepa original de *Zymomonas* utilizadora de xilosa que es una cepa a partir de la cual se producen cepas mejoradas usando el procedimiento de adaptación al estrés descrito en esta memoria.

Como se usa en esta memoria, "medio de cultivo de alimentación" se refiere al medio que se añade al recipiente de cultivo continuo.

15 Como se usa en esta memoria, "hidrolizado de biomasa" e "hidrolizado celulósico" se refiere a un producto producido a partir de biomasa, que es material celulósico, normalmente a través de procesos de pretratamiento y sacarificación. En el hidrolizado están presentes azúcares fermentables, así como otros productos.

#### Utilización mejorada de xilosa

20 Los solicitantes han descubierto que se pueden fabricar cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa para utilizar mayores cantidades de xilosa en condiciones de fermentación con estrés adaptando las cepas a través de un proceso que implica un crecimiento continuo en condiciones de estrés. El aumento de la utilización de xilosa se compara con la utilización de xilosa por una cepa de *Zymomonas* que utiliza xilosa que no ha sufrido proceso de adaptación como se describe en esta memoria. Las condiciones de estrés usadas aquí durante la adaptación de cepas de *Zymomonas* proporcionan condiciones de estrés similares a las presentes cuando se cultivan cepas de *Zymomonas* en medio que comprende hidrolizado de biomasa. Por tanto las presentes cepas adaptadas pueden haber aumentado la utilización de xilosa cuando se cultivan en medio que comprende hidrolizado de biomasa, proporcionando de este modo un crecimiento y formación de producto más eficientes.

30 Cualquier cepa de *Zymomonas* que es capaz de utilizar xilosa como una fuente de carbono puede ser una cepa original o de partida proporcionada para adaptación y usada en el presente método para preparar las cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa adaptadas a fermentación con estrés que presentan la utilización mejorada de xilosa de acuerdo con la presente invención. Cepas de *Zymomonas* tales como *Z. mobilis* que se han modificado para la fermentación de xilosa a etanol son particularmente útiles. Genes endógenos pueden proporcionar parte de la vía metabólica, o se pueden transformar por cualquier técnica de manipulación genética conocida para proporcionar una proteína con actividad enzimática útil para el metabolismo de la xilosa. Por ejemplo, la transcetolasa endógena puede complementar otras actividades enzimáticas introducidas en la creación de una ruta de utilización de xilosa. Normalmente se pueden introducir cuatro genes en una cepa de *Zymomonas*, tal como *Z. mobilis*, para la expresión de cuatro enzimas implicadas en el metabolismo de la xilosa como se describe en el documento US 5514583. Estos incluyen genes que codifican xilosa isomerasa, que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa y xiluloquinasa, que fosforila la xilulosa para formar xilulosa-5-fosfato. Además, la transcetolasa y transaldolasa, dos enzimas de la ruta de las pentosas fosfato, convierten xilulosa 5-fosfato en sustancias bioquímicas intermedias que acoplan el metabolismo de las pentosas a la ruta glucolítica de Entner-Doudoroff permitiendo el metabolismo de la xilosa a etanol. Se pueden obtener secuencias de DNA que codifican estas enzimas a partir de cualquiera de los numerosos microorganismos que son capaces de metabolizar la xilosa, tales como bacterias entéricas, y algunas levaduras y hongos. Las fuentes para las regiones codificantes incluyen *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhodobacter*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonads*, y *Zymomonas*. Particularmente útiles son las regiones de *E. coli* codificantes.

45 Las secuencias de DNA codificantes están unidas operativamente a promotores que se expresan en células *Z. mobilis* tales como los promotores de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* (promotor GAP) y enolasa de *Z. mobilis* (promotor ENO). Las regiones codificantes se pueden expresar de forma individual a partir de promotores, o dos o más regiones codificantes se pueden unir en un operón con expresión del mismo promotor. Los genes quiméricos resultantes se pueden introducir en *Zymomonas* y mantenerse en un plásmido, o integrarse en el genoma usando por ejemplo recombinación homóloga, integración sitio-dirigida, o integración aleatoria. Las cepas que utilizan xilosa que son de particular uso incluyen ZM4(pZB5) (descrita en los documentos US 5514583, US 6566107, y US55712133), 8b (US 20030162271; Mohagheghi et al., (2004) Biotechnol. Lett. 25; 321-325), así como ZW658 (ATTCC # PTA-7858), ZW800, ZW801-4, ZW801-5, y ZW801-6 (descritas en la publicación de solicitud de patente de EE.EE. #US 2008-0286870 A1, en tramitación con la presente y de propiedad común).

55 Las cepas de *Zymomonas* que se modifican adicionalmente para utilizar otros azúcares que no son sustratos naturales, se pueden usar también en el presente procedimiento. Un ejemplo es una cepa de *Z. mobilis* modificada para la utilización de arabinosa como se describe en el documento US 5843760.

## Método de adaptación

En el presente método, una cepa de *Zymomonas* que utiliza xilosa (una cepa de partida u original como se ha descrito anteriormente) se cultiva continuamente en medio que comprende xilosa en condiciones de fermentación con estrés. El medio puede contener xilosa como único azúcar, o puede contener una mezcla de xilosa y otros azúcares tales como glucosa. Se prefiere una alta concentración de azúcares en el medio, por ejemplo al menos aproximadamente 50 g/L de cada uno de xilosa y glucosa. Puede haber más de uno o ambos azúcares.

La cepa de *Zymomonas* original que utiliza xilosa se cultiva en primer lugar sin condiciones de estrés y se produce etanol. Se añade medio de cultivo de alimentación a una velocidad de dilución para mantener el cultivo continuo. Normalmente se deja que el cultivo se estabilice, lo que puede tardar aproximadamente 9-12 días, aunque algunos cultivos pueden tardar más tiempo para estabilizarse. La estabilización es con respecto a la DO600, utilización de azúcar, y producción de etanol tal como se mide en el efluente del fermentador. El etanol en el cultivo estabilizado se puede producir a un nivel de aproximadamente 18 g/L, 22 g/L, 40 g/L o superior. Se añaden después componentes adicionales al medio de fermentación que causan condiciones de estrés para el metabolismo de las células de *Zymomonas*. Estos componentes se pueden añadir justo después de la estabilización del cultivo, o después de que el cultivo se fermente en condiciones estables durante un periodo de tiempo adicional. Los componentes que se pueden añadir como agentes estresantes incluyen amoníaco y ácido acético, lo que da por resultado el medio que contiene acetato amónico, o acetato amónico. La presencia de acetato amónico y etanol en el medio de fermentación aplica estrés a las células de *Zymomonas*, lo que normalmente causa una disminución de la DO600, disminución en la utilización de xilosa, y disminución en la producción de etanol. La velocidad de dilución se puede aumentar o disminuir para dirigir la DO600, utilización de xilosa, y concentración de etanol. El cultivo en condiciones de estrés se cultiva de forma continua. Se puede añadir más amoníaco y ácido acético o acetato amónico al menos una o más veces durante la fermentación continua del cultivo con estrés. La adición puede ser más de una vez, tal como en etapas para aumentar gradualmente la concentración de acetato amónico en el medio de fermentación.

El amoníaco y ácido acético se pueden añadir como acetato amónico inicialmente para alcanzar concentraciones de aproximadamente 24 mM de acetato amónico o aproximadamente 48 mM de acetato amónico. Amoníaco y ácido acético o acetato amónico se pueden añadir en uno o más incrementos para alcanzar concentraciones que son entre aproximadamente 64 mM y 210 mM de acetato amónico. Normalmente se añade amoníaco y ácido acético o acetato amónico en cuatro o más etapas a lo largo del tiempo para aumentar gradualmente la concentración en el medio de fermentación del cultivo en condiciones de estrés. Se produce etanol en el cultivo en condiciones de estrés por las células de *Zymomonas* y puede variar dependiendo de la tasa de producción, normalmente para el etanol es de entre 13 g/L y 54 g/L. La DO600 nm puede variar, y normalmente es de entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 4,8.

Después de un periodo total de fermentación continua de aproximadamente dos meses o más, del cultivo con estrés se pueden aislar cepas adaptadas de *Zymomonas*. Se pueden tomar del cultivo muestras y sembrarlas en placas para aislar colonias, o hacerlas crecer en cultivo y después sembrarlas en placas para aislar colonias. Se prueban células de colonias individuales para determinar la capacidad de las células o cepas aisladas cultivadas a partir de las células para utilizar xilosa y producir etanol en el medio que contiene alta concentración de azúcares, amoníaco y acetato. Se produce etanol en los cultivos por las células de *Zymomonas* adaptadas. Entre las cepas aisladas analizadas, se identifican cepas que muestran mayor utilización de xilosa y mayor producción de etanol en comparación con la cepa original o de partida que utiliza xilosa antes de la adaptación. Un experto en la técnica es consciente de que habrá variación en la cantidad de xilosa utilizada y etanol producido en diferentes cepas aisladas. Sin embargo, las cepas que han aumentado la utilización de xilosa y la producción de etanol serán fácilmente identificables y reconocidas entre los aislados de los cultivos de fermentación con estrés.

## Cepas adaptadas

En esta memoria se describen cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa, adaptadas a fermentación con estrés, con utilización mejorada de xilosa. Estas se pueden caracterizar por un aumento en la utilización de xilosa de al menos aproximadamente 12% en comparación con la correspondiente cepa pero no adaptada, cuando se cultiva en condiciones de estrés en donde el medio de fermentación contiene etanol, acetato amónico y alta concentración de azúcares. Las cepas adaptadas pueden usar al menos aproximadamente 12%, 17%, 20%, 25%, ó 30% más de xilosa. Las cepas de *Zymomonas* que utilizan xilosa que tienen estas características se pueden aislar de forma rutinaria usando el método descrito. La cantidad de utilización de xilosa dependerá de factores que incluyen la cepa original, las condiciones de fermentación y la propia cepa adaptada particular.

En una serie de condiciones descritas en el Ejemplo 3 de esta memoria con medios que contienen 60 g/L de xilosa, 80 g/L de glucosa, 9,54 g/L de acetato, y  $\text{NH}_4\text{OH}$  160 mM cuando se parte de una densidad celular de 0,1 de DO a 600 nm, cepas mejoradas adaptadas pueden utilizar al menos 70%, 80%, 85%, u 89% de xilosa mientras que la cepa original utiliza aproximadamente 17% de xilosa. En condiciones variadas, las cepas adaptadas pueden utilizar al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% ó 70% de xilosa en comparación con 30% o menos por cepas no adaptadas por fermentación con estrés como se describe en esta memoria.

Las cepas adaptadas producidas por el método de la invención se pueden usar para fermentación de azúcares para producir productos de fermentación tales como el etanol. Las cepas son particularmente útiles para fermentación en medio que contiene hidrolizado de biomasa que contiene componentes que proporcionan condiciones de fermentación con estrés. La biomasa lignocelulósica se somete normalmente a ciertos procesos para producir azúcares fermentables. Estos procesos pueden incluir pre-procesamiento, pre-tratamiento, y sacarificación. Pre-procesamiento es cualquier acción que hace a la biomasa más susceptible al pre-tratamiento. Pre-tratamiento es cualquier procesamiento que hace a la biomasa más susceptible a la sacarificación. La sacarificación incluye cualquier procesamiento que hidroliza a los carbohidratos de la biomasa a azúcares fermentables. Los azúcares fermentables incluyen mono- y oligo-sacáridos que se pueden utilizar por un biocatalizador para fermentación. Se pueden usar metodologías cualesquiera comúnmente conocidas para el pre-procesamiento y pre-tratamiento de biomasa incluyendo ningún pre-procesamiento y/o ningún pre-tratamiento. Se pueden utilizar técnicas de sacarificación comúnmente conocidas para producir un hidrolizado para fermentación de tal manera que los azúcares están disponibles para utilización, incluyendo la hidrólisis enzimática y/o autohidrólisis o hidrólisis química. Por ejemplo, la biomasa se puede pretratar y sacarificar como se describe en la publicación de patente de EE.UU. US20070031918A1 en tramitación con la presente y de propiedad común.

#### Fermentación para la producción de etanol

Para la producción de etanol, una cepa de *Zymomonas* producida por el método de la invención se pone en contacto con medio que contiene azúcares mixtos que incluyen xilosa. Cuando la concentración de azúcares mixtos es alta de manera que se inhibe el crecimiento, el medio puede incluir sorbitol, manitol, o sus mezclas. Galactitol o ribitol pueden reemplazar o ser combinados con sorbitol o manitol. *Zymomonas* crece en el medio donde tiene lugar la fermentación y se produce etanol. La fermentación se realiza sin aire complementario, oxígeno u otros gases (que puede incluir condiciones tales como fermentación anaeróbica, microaeróbica o microaerofílica), durante al menos 24 horas, y se puede realizar durante 30 o más horas. El momento de alcanzar la máxima producción de etanol es variable, dependiendo de las condiciones de fermentación. Normalmente, si los inhibidores están presentes en el medio, se requiere un periodo de fermentación más largo. La fermentación se puede realizar a temperaturas que están entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C, a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5.

Las *Zymomonas* que utilizan xilosa (tales como *Z. mobilis*) se pueden cultivar en medio que contiene azúcares mixtos que incluyen xilosa, en fermentadores a escala de laboratorio y en fermentaciones de mayor escala en donde se producen cantidades comerciales de etanol. Cuando se desea la producción comercial de etanol, se puede aplicar una variedad de metodologías de cultivo para producir etanol utilizando las cepas adaptadas descritas en esta memoria. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una producción a gran escala mediante metodologías de cultivo tanto por lotes como continuo. Un método clásico de cultivo por lotes es un sistema cerrado en donde la composición del medio se fija al comienzo del cultivo y no se somete a alteraciones artificiales durante el proceso de cultivo. Por tanto, al comienzo del proceso de cultivo el medio se inocula con el organismo deseado y se permite que tenga lugar el crecimiento o actividad metabólica sin añadir nada al sistema. Sin embargo, normalmente un cultivo por "lotes" es por lotes con respecto a la adición de fuente de carbono y a menudo se hacen intentos en controlar factores tales como el pH y concentración de oxígeno. En sistemas por lotes las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que el cultivo se termina. En los cultivos por lotes las células se moderan a través de una fase de latencia estática a una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente a una fase estacionaria en donde la velocidad de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria morirán finalmente. Las células en la fase logarítmica son frecuentemente responsables de la mayor parte de la producción de producto final o producto intermedio en algunos sistemas. En otros sistemas se puede obtener producción en fase estacionaria o post-exponencial.

Una variación en el sistema estándar por lotes es el sistema de alimentación por lotes. Los procesos de cultivo mediante alimentación por lotes son también adecuados para el crecimiento de las presentes cepas y comprenden un sistema típico por lotes con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos a medida que el cultivo progresa. Los sistemas de alimentación por lotes son útiles cuando la represión por catabolitos es apta para inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medida de la concentración real de sustrato en sistemas de alimentación por lotes es difícil y por tanto se estima sobre la base de los cambios de factores mensurables tales como el pH y la presión parcial de gases residuales tales como el CO<sub>2</sub>. Métodos de cultivo por lotes y de alimentación por lotes son comunes y muy conocidos en la técnica y se pueden encontrar ejemplos en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Crueger, Crueger, y Brock, Segunda Edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, o Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36, 227, (1992).

La producción comercial de etanol también puede llevarse a cabo con un cultivo continuo. Los cultivos continuos son sistemas abiertos en los que un medio de cultivo definido se añade continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio acondicionado se separa simultáneamente durante el procesamiento. Los cultivos continuos generalmente mantienen las células a una alta densidad constante en fase líquida en donde las células están principalmente en crecimiento en fase logarítmica. Alternativamente, el cultivo continuo puede ponerse en práctica con células inmovilizadas en donde se añade continuamente carbono y nutrientes, y los productos valiosos, subproductos o productos de desecho se separan continuamente de la masa celular. La inmovilización celular se

puede realizar usando una serie amplia de soportes sólidos compuestos por materiales naturales y/o sintéticos, como es sabido por un experto en la técnica.

El cultivo continuo o semicontinuo permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan al crecimiento celular o concentración de producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o nivel de nitrógeno en una proporción fija y permitirá moderar los otros parámetros. En otros sistemas, un número de factores que afectan al crecimiento se pueden alterar continuamente mientras que la concentración celular, medida por la turbidez del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos tratan de mantener condiciones de crecimiento en estado estacionario y así la pérdida celular debida al medio que se extrae debe equilibrarse con la tasa de crecimiento celular en el cultivo. Métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para procesos de cultivo continuo así como técnicas para maximizar la tasa de formación de producto son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial y una variedad de métodos se detallan por Brock, *supra*.

Particularmente adecuado para la producción de etanol es un régimen de fermentación como sigue. La cepa adaptada deseada se cultiva en matraces de agitación en medio semi-complejo a de aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C con agitación a aproximadamente 150 rpm en agitadores orbitales y después se transfiere a un fermentador de siembra de 10 L que contiene medio similar. El cultivo de siembra se hace crecer en el fermentador de siembra anaeróbicamente hasta que la DO<sub>600</sub> es entre 3 y 6, cuando se transfiere al fermentador de producción en donde los parámetros de fermentación se optimizan para la producción de etanol. Los volúmenes de inóculo típicos transferidos desde el depósito de siembra al depósito de producción se extienden desde aproximadamente 2% a aproximadamente 20% v/v. El medio de fermentación típico contiene mínimos componentes del medio tales como fosfato potásico (1,0-10,0 g/l), sulfato amónico (0-2,0 g/l), sulfato magnésico (0-5,0 g/l), una fuente de nitrógeno complejo tal como extracto de levadura o productos basados en la soja (0-10 g/l). Una concentración final de aproximadamente 5 mM de sorbitol o manitol está presente en el medio. Azúcares mixtos que incluyen xilosa y al menos un azúcar adicional tal como glucosa (o sacarosa), que proporcionan una fuente de carbono, se añaden continuamente al recipiente de fermentación por agotamiento de la fuente de carbono inicial por lotes (50-200 g/l) para maximizar la proporción y título de etanol. Las velocidades de alimentación de la fuente de carbono se ajustan dinámicamente para asegurar que el cultivo no está acumulando glucosa en exceso, lo que podría conducir a la acumulación de subproductos tóxicos tales como ácido acético. Con el fin de maximizar el rendimiento de etanol producido a partir del sustrato utilizado, el crecimiento de biomasa está restringido por la cantidad de fosfato que está dosificado inicialmente o que es suministrado durante el curso de la fermentación. La fermentación se controla a pH 5,0-6,0 usando disolución cáustica (tal como hidróxido amónico, hidróxido potásico, o hidróxido sódico) o ácido sulfúrico o fosfórico. La temperatura del fermentador se controla a 30°C-35°C. Con el fin de minimizar la formación de espuma, se añaden al recipiente, según sea necesario, agentes antiespumantes (basados en silicona de cualquier clase, orgánicos, etc.). Un antibiótico, para el que hay un marcador resistente a los antibióticos en la cepa, tal como la kanamicina, se puede usar opcionalmente para minimizar la contaminación.

Cualquier conjunto de condiciones descritas anteriormente, y además variaciones de estas condiciones que son bien conocidas para el experto en la técnica, son condiciones adecuadas para la producción de etanol por una cepa adaptada de *Zymomonas*, que utiliza xilosa, producida por el método de la invención.

El etanol producido en la fermentación se puede recuperar usando diversos métodos conocidos en la técnica. Como ejemplo específico, etanol producido biológicamente se puede aislar del medio de fermentación usando métodos conocidos en la técnica para fermentaciones ABE (ver por ejemplo, Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:639-648 (1998), Groot et al., Process. Biochem. 27:61-75 (1992), y sus referencias). Por ejemplo, se pueden separar sólidos del medio de fermentación por centrifugación, filtración, decantación, o similares. Después, el etanol se puede aislar del medio de fermentación usando métodos tales como destilación, destilación azeotrópica, extracción líquido-líquido, adsorción, extracción por arrastre con gas, evaporación por membranas, o pervaporación.

### Ejemplos

La presente invención se define adicionalmente en los Ejemplos siguientes. Se debe entender que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente.

Los significados de las abreviaturas son como sigue: "hr" significa hora(s), "min" significa minuto(s), "s" significa segundo(s), "d" significa día(s), "L" significa litro(s), "ml" significa mililitro(s), "μL" significa microlitro(s), "g" significa gramo(s), "μg" significa microgramo(s), "ng" significa nanogramo(s), "g/L" significa gramos por litro, "mM" significa milimolar, "μM" significa micromolar, "nm" significa nanómetro(s), "μmol" significa micromol(es), "pmol" significa picomol(es), "DO600" significa densidad óptica medida a 600 nm.

## Métodos generales

## Método de HPLC

5 El análisis se realizó con un HPLC Agilent serie 1100 y el software Agilent ChemStation para LC 3D. La columna fue BioRad Aminex HPX-87H (Columna 125-0140 de Análisis Orgánico por HPLC) con Cartucho Cation-H BioRad Micro-Guard (125-0129). Las condiciones de operación fueron:

Flujo	0,6 mL/min
Disolvente	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01 N
Tiempo de parada	25 min
Volumen de Inyección	5 µL
Autocargador de muestras	Control de temp. @ 10°C ó 4°C
Temperatura de la columna	55°C
Detector	Indice de refracción (40°C)
	con curvas de calibración por patrón externo

## Ejemplos

## Ejemplo 1

Adaptación de *Zymomonas* a la fermentación con estrés

10 Cultivos de la cepa ZW801-4 de *Z. mobilis* se cultivaron en condiciones de estrés como sigue. ZW801-4 es una cepa recombinante de *Z. mobilis* que utiliza xilosa que se describió en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. en tramitación con la presente y de propiedad común, #US 2008-0286870 A1. La cepa ZW801-4 se derivó de la cepa ZW800, que se derivó de la cepa ZW658, todo como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. # 11/862566. La ZW658 se construyó integrando dos operones, *P<sub>gap</sub>xylAB* y *P<sub>gap</sub>taltkt*, que contienen cuatro genes que utilizan xilosa que codifican xilosa isomerasa, xiluloquinasa, transaldolasa y transcetolasa, en el genoma de ZW1 (ATCC #31821) a través de eventos de transposiciones secuenciales, y seguido por adaptación en medios selectivos que contienen xilosa. La ZW658 se depositó como ATCC #PTA-7858. En la ZW658, el gen que codifica glucosa-fructosa oxidoreductasa fue inactivado por inserción usando recombinación homóloga mediada por huésped, de doble entrecruzamiento, y la resistencia a la espectinomicina como un marcador seleccionable para crear ZW800. El marcador de resistencia a la espectinomicina, que se unió a sitios loxP, se separó por recombinación específica de sitio usando recombinasa Cre para crear ZW801-4.

25 Se llevaron a cabo cultivos continuos de ZW801-4 en fermentadores con pH y temperatura controladas, agitados de 250 ml (Sixfors; Bottmingen, Suiza). El medio basal para cultivo fue 5 g/L de extracto de levadura, fosfato amónico 15 mM, 1 g/L de sulfato magnésico, y sorbitol 10 mM. La temperatura se controló a 33°C y el pH fue 5,8 para los cultivos iniciales. Se iniciaron cuatro cultivos: dos con medio basal más 50 g/L de cada una de glucosa y xilosa (fermentadores F1C y F4B), uno con medio basal más 100 g/L de glucosa y 80 g/L de xilosa (fermentador F2B), y uno con medio basal más 50 g/L de xilosa y posteriormente aumentado a 80 g/L de xilosa (F6). Todos los cultivos se iniciaron sin acetato amónico añadido y a una DO600 de 0,1. El efluente se analizó para etanol, xilosa y glucosa en puntos temporales indicados más adelante por HPLC como se indica en Métodos Generales. Se usaron medios basales con acetato amónico añadido como medios estresantes, y la concentración de acetato amónico por encima de la presente en los medios basales se usa en la descripción más adelante.

35 El fermentador F6 se hizo funcionar continuamente con una velocidad de dilución de 0,065 h<sup>-1</sup>. A los 12 días de cultivo el efluente se estabilizó en aproximadamente 18 g/L de etanol, utilización casi completa de xilosa y DO600 de aproximadamente 3,8, y se mantuvo estable hasta el día 21 mientras que la velocidad de dilución aumentó a 0,9 h<sup>-1</sup>. El día 21 se añadió acetato amónico para dar 24 mM en el medio basal más la alimentación de xilosa. La concentración de salida de xilosa aumentó a 10 g/L, la DO600 disminuyó a 1,5 y la concentración de etanol se redujo a 14 g/L. La velocidad de dilución se redujo a 0,045 h<sup>-1</sup>. Después de la disminución de la velocidad de dilución, la xilosa en el efluente bajó a cerca de 0, el etanol aumentó a 20 g/L y la DO600 aumentó a 2,4. A los 30 días la concentración de acetato amónico se aumentó a 32 mM. Las concentraciones de xilosa y etanol en el efluente permanecieron constantes, pero la DO600 disminuyó a 1,8. A los 35 días de cultivo la concentración de acetato amónico se aumentó a 40 mM. Las condiciones de cultivo se mantuvieron hasta el día 50 cuando la concentración de xilosa se aumentó a 80 g/L. Tras el aumento de la concentración de xilosa, la concentración de etanol aumentó a 30 g/L +/- 4 g/L y la velocidad de dilución se aumentó a 0,08 h<sup>-1</sup> para mantener la OD600 a 4. La concentración de acetato amónico se aumentó en dos etapas iguales el día 71 y 78 para dar acetato amónico 48

- mM. Ningún cambio en la velocidad de dilución o concentración de salida de xilosa y etanol acompañó a los aumentos de acetato amónico. Las concentraciones de amonio y acetato se aumentaron adicionalmente en dos etapas iguales a 64 mM antes del día 92. La velocidad de dilución y la concentración de etanol se mantuvieron constantes, pero la DO600 descendió a 1,5 antes del día 98. Las células se agregaron. El cultivo se trasladó a un fermentador limpio. La DO600 se elevó a 3,8. La concentración de acetato amónico se aumentó en dos etapas iguales a 80 mM antes del día 104. La concentración de xilosa residual aumentó a 3 g/L. El cultivo continuo se llevó a cabo hasta el día 205 mientras se aumentaba la concentración de acetato amónico a 160 mM en 10 etapas iguales a una concentración final de 160 mM. El pH se mantuvo en 5,8. La DO600 se mantuvo entre 1,4 y 4, y la concentración de xilosa residual varió entre 2 y 7 g/L.
- 5 El fermentador F2B fue difícil de controlar durante 25 días y osciló entre aproximadamente 3 y 8 de DO600, 0 y 30 g/L de glucosa, 20 y 50 g/L de xilosa y 22 a 70 g/L de etanol. La oscilación de glucosa se redujo tras el día 25 y se estabilizó en 5-6 g/L. Esa concentración de glucosa y una velocidad de dilución de 0,04 h<sup>-1</sup> se mantuvieron hasta el día 40. El cultivo se trasladó a un fermentador limpio el día 43 y la oscilación de glucosa volvió durante 8 días antes de regresar a 4 g/L de glucosa, 30 g/L +/- 3 g/L de xilosa y 60 g/L de etanol a una velocidad de dilución de 0,065 h<sup>-1</sup> durante 76 días de cultivo.
- 10 El fermentador F1 C se estabilizó en niveles muy bajos de glucosa y xilosa; 40 g/L de etanol, DO600 de 6 y una velocidad de dilución de 0,07 h<sup>-1</sup> en 10 días de cultivo. Se añadió acetato amónico hasta 48 mM. La concentración de xilosa aumentó a 6 g/L y la velocidad de dilución aumentó a 0,08 h<sup>-1</sup>. El acetato amónico se aumentó a 80 mM en 4 etapas iguales entre el día 15 y el día 23. El cultivo se trasladó a un fermentador limpio en los días 41 y 69. La velocidad de dilución se mantuvo entre 0,08 y 0,1 h<sup>-1</sup> mientras la concentración de acetato amónico se aumentó en etapas a 160 mM antes del día 97. Durante el periodo de aumentos de la concentración de acetato amónico la DO600 fue de entre 3,6 y 5,3, la concentración de etanol entre 39 y 45 g/L, y la concentración de xilosa entre 0 y 8 g/L. La concentración de amonio se aumentó adicionalmente a 210 mM en etapas mediante adición de hidróxido amónico al medio que contenía acetato amónico con ácido fosfórico añadido para mantener el pH a 5,8 antes del día 139. Durante este período la DO600 descendió a aproximadamente 3,2, la concentración de etanol aumentó a aproximadamente 51 g/L, y la concentración de xilosa residual fue 2,2 g/L.
- 20 El fermentador F4B también comenzó con medio basal y 50 g/L de cada una de glucosa y xilosa con pH mantenido a 5,8. Fue estable en 40 g/L de etanol, una velocidad de dilución de 0,1 h<sup>-1</sup> y niveles muy bajos de glucosa y xilosa antes del día 9. La concentración de acetato amónico se llevó a 48 mM el día 12. La velocidad de dilución se redujo a 0,07 h<sup>-1</sup> para mantener la DO y la utilización de azúcar, y el acetato amónico se aumentó a 64 mM en dos etapas iguales antes del día 22. La velocidad de dilución variaba al igual que la xilosa restante hasta el día 28. La velocidad de dilución permaneció constante a 0,082 mientras que el acetato amónico se aumentó a 96 mM en 4 etapas iguales antes del día 43. Durante ese periodo la concentración de etanol aumentó ligeramente a aproximadamente 42 g/L y la DO600 disminuyó de aproximadamente 4,8 a 3,5. En el día 51 la alimentación se cambió a medios basales con 80 g/L de glucosa y 60 g/L de xilosa con acetato amónico 96 mM. La concentración de etanol aumentó a 41 a 51 g/L con alguna variación diaria. La xilosa restante aumentó a 16 g/L y la velocidad de dilución se estabilizó en 0,09 h<sup>-1</sup> y la DO600 en aproximadamente 4,9 antes del día 70. Se añadió acetato amónico a una concentración de 160 mM en 8 etapas iguales antes del día 126. La concentración de etanol aumentó a 63 g/L mientras que la velocidad de dilución y la DO600 permanecían constantes.
- 30 Al igual que con el fermentador F1C, la concentración de amonio se aumentó adicionalmente a 210 mM en etapas, con ácido fosfórico añadido para mantener el pH a 5,8, antes del día 168. La velocidad de dilución se mantuvo en 0,08 h<sup>-1</sup>. Durante este período la DO600 varió entre 3,7 y 5,6, la concentración de etanol aumentó a aproximadamente 63 g/L, y la concentración de xilosa residual estuvo en 18 g/L. El cultivo se mantuvo durante 8 días en estas condiciones y luego el pH se mantuvo en 5,65 durante otros 7 días. La DO600 bajó a 3,5 mientras que las concentraciones de etanol y xilosa permanecían relativamente constantes.
- 35
- 40
- 45

## Ejemplo 2

Evaluación de cultivos derivados de fermentadores de cultivos continuos con adaptación

- Muestras de los cultivos continuos con adaptación se tomaron en primer lugar del fermentador F1 C el día 74, del fermentador F4B el día 69 y del fermentador F6 el día 78 y en diversos momentos después de los primeros muestreos. Todas se conservaron a -80°C y se revivieron en medios RMG5 para las pruebas. Los cultivos de siembra se hicieron crecer a 4,5 de DO600 en medios basales más 75 g/L de glucosa y 25 g/L de xilosa a 33°C.
- 50

- El medio basal para las pruebas fue: 5 g/L de extracto de levadura, fosfato amónico dibásico 15 mM, 1 g/L de sulfato magnésico, sorbitol 10 mM, y 4 g/L de hidrogenocarbonato potásico. La fuente de carbono fue 80 g/L de glucosa y 60 g/L de xilosa. El medio se usó como tal para controles de bajo estrés o con la adición de acetato amónico 80 mM, 120 mM ó 160 mM con el pH ajustado a 5,8 con ácido fosfórico.
- 55

El volumen de fermentación fue 100 ml y las fermentaciones se realizaron a 33°C con agitación a 120 rpm. El cultivo se inició mediante adición de células preparadas a partir de medios de cultivo de siembra a una DO600 inicial de 0,1. Las células de los medios de cultivo de siembra se recogieron por centrifugación y se lavaron con los medios de

prueba. El cultivo se controló por DO a 600 nm. El etanol, xilosa y glucosa se controlaron todos por HPLC. La cepa ZW801-4 usada para iniciar los cultivos de adaptación se usó como control.

5 Los tres cultivos adaptados crecieron y utilizaron glucosa en la misma proporción que ZW801-4 en medios sin acetato amónico añadido. A 160 mM de acetato amónico, ZW801-4 creció tras un periodo de latencia prolongado, mientras que los 3 cultivos adaptados utilizaron toda la glucosa en 42 hr.

Aunque todos los cultivos utilizaron 60 g/L de xilosa en proporciones similares en medios sin acetato amónico añadido, los tres cultivos adaptados utilizaron toda la xilosa en 46 horas en medios con acetato amónico 120 mM, pero ZW801-4 requirió 60 horas.

10 La mayor parte del procedimiento de prueba se repitió en tiempos adicionales de adaptación de los fermentadores continuos.

### Ejemplo 3

#### Comportamiento de cepas adaptadas aisladas

15 Se aislaron colonias individuales mediante siembra en placas que contenían glucosa y se usaron para cultivar cepas purificadas de los cultivos adaptados en varias etapas como se indica en la Tabla 1. Las cepas derivadas de colonias individuales se probaron usando los medios y condiciones descritas para el conjunto de las pruebas de cultivo en acetato amónico 160 mM.

20 Los cultivos de siembra se hicieron crecer en medios DP1 descritos anteriormente con 75 g/L de glucosa y 25 g/L de xilosa. Se iniciaron fermentaciones de prueba de azúcares mixtos añadiendo cultivo de siembra a una DO600 nm inicial de 0,1. El pH inicial fue 5,8; la temperatura fue 33°C y el cultivo de 100 ml se agitó a 120 rpm en un incubador con agitación.

25 Se usó ZW801-4 como control de cultivo no adaptado en cada una de una serie de fermentaciones que probaron diferentes cepas aisladas de los cultivos continuos de adaptación. Una segunda cepa llamada NS1302-2, que se aisló del fermentador F4B en la ronda inicial de pruebas y que repetidamente utilizaba más xilosa y producía más etanol cuando se probó frente a la cepa ZW8014 no adaptada en presencia de altos niveles de acetato amónico, se usó como control positivo en cada uno de los conjuntos de fermentaciones de prueba.

Todas las cepas utilizaron toda la glucosa en la fermentación de azúcares mixtos antes de 44 horas, pero todas tenían cantidades variables de xilosa restante, por tanto la xilosa restante en fermentación de 44 horas se usó como una medida de adaptación a las condiciones de estrés. Los resultados se dan en la Tabla 1.

30 Tabla 1. Descripción de cepas aisladas de adaptaciones de cultivos continuos y la cantidad de xilosa restante cuando han fermentado un medio inicial de 80 g/L de glucosa y 60 g/L de xilosa más acetato amónico 160 mM durante 44 horas.

Fermentador	Descripción de las cepas: condiciones en el aislamiento de colonias	g/L de xilosa restante	
Ninguno	Cepa inicial de control	ZW801-4	55
F4B	Aislado control	NS1302-2	10
F1C	Acetato amónico 160 mM pH 5,8	NS1368-1	24
F1C	Acetato amónico 160 mM pH 5,8	NS1368-2	22
F1C	Acetato amónico 160 mM pH 5,8	NS1368-3	11
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	NS1369-1	13
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	NS1369-2	26
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	NS1369-3	22

ES 2 597 443 T3

Fermentador	Descripción de las cepas: condiciones en el aislamiento de colonias	g/L de xilosa restante	
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	NS1370-1	4
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	NS1370-2	2
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	Ns1370-3	17
Ninguno	Cepa inicial de control	ZW801-4	55
F4B	Aislado control	NS1302-2	10
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,6	NS1380-1	13
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,6	NS1380-2	15
F1C	Acetato amónico 210 mM pH 5,6	NS1380-3	24
Ninguno	Cepa inicial de control	ZW801-4	55
F4B	Aislado control	NS1302-2	10
F4B	Acetato amónico 144 mM pH 5,8	NS1371-1	55
F4B	Acetato amónico 144 mM pH 5,8	NS1371-2	13
F4B	Acetato amónico 160 mM PH 5,8	NS1372-1	12
F4B	Acetato amónico 160 mM pH 5,8	NS1372-2	8
F4B	Acetato amónico 160 mM pH 5,8	NS1372-3	10
F4B	Acetato amónico 210 mM pH 5,65	NS1373-1	5
F4B	Acetato amónico 210 mM pH 5,65	NS1373-4	8
F4B	Acetato amónico 210 mM pH 5,65	NS1373-5	4
Ninguno	Cepa inicial de control	ZW801-4	47
F4B	Aislado control	NS1302-2	7
F4B	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	NS1383-1	4
F4B	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	NS1383-2	17
F4B	Acetato amónico 210 mM pH 5,8	NS1383-3	12
Ninguno	Cepa inicial de control	ZW801-4	47
F4B	Aislado control	NS1302-2	7

Fermentador	Descripción de las cepas: condiciones en el aislamiento de colonias	g/L de xilosa restante	
F6	Acetato amónico 112 mM pH 5,8	NS1375-1	16
F6	Acetato amónico 112 mM pH 5,8	NS1375-2	16
F6	Acetato amónico 112 mM pH 5,8	NS1375-3	21
F6	Acetato amónico 136 mM pH 5,8	NS1382-1	19
F6	Acetato amónico 136 mM pH 5,8	NS1382-3	20

- 5 Las cepas NS1369, NS1370, NS1372, NS1373, y NS1375 dejaron todas menos xilosa que ZW801 y se comportaron casi tan bien como el control positivo, NS1302. Fueron elegidas para evaluación adicional en medios que contenían 60% en volumen de hidrolizado producido a partir de mazorca de maíz molida que había sido pretratada por un amoníaco diluido y proceso térmico, después enzimáticamente hidrolizada con una mezcla de preparaciones de enzimas celulasa y hemicelulasa en 25% de sólidos de mazorca de maíz pretratada, pH 5,3 y 48°C durante 96 horas, todo como se describe en la publicación de patente de EE.UU., en tramitación con la presente y de propiedad común, US20070031918A1. Las concentraciones de los principales azúcares y de acetato en el hidrolizado resultante fueron:

Glucosa:	62,3 g/L
Xilosa:	40,2 g/L
Arabinosa	5,7 g/L
Celobiosa	9,6 g/L
Acetato	6,4 g/L

- 10 El 40% restante de los medios de prueba se preparó para ajustar las concentraciones de los medios finales a lo siguiente:

- 5 g/L de extracto de levadura
- 2 g/L de hidrogenofosfato potásico
- 1 g/L de sulfato magnésico
- 100 g/L de glucosa
- 80 g/L de xilosa
- 7 g/L de acetato

Las fermentaciones se realizaron a 33°C con pH controlado a 5,8 mediante la adición de KOH. La inoculación de partida fue 0,2 tal como se calculó a partir de la DO de inóculo de siembra producido en medios base con 75 g/L de glucosa y 25 g/L de xilosa como se describe para las fermentaciones de prueba en los medios definidos anteriormente.

- 15 Todas las cepas, incluida la ZW801-4, fueron capaces de utilizar toda la glucosa en los medios en estas condiciones. Los resultados en términos de xilosa restante en aproximadamente el punto temporal (43 hr) cuando se utilizó toda la glucosa, etanol en ese punto temporal y después la xilosa restante y etanol producido después de que la tasa de utilización de xilosa había descendido a cero (67 hr), se dan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Xilosa restante y etanol producido a partir de cultivos aislados en g/L

Fermentador de origen	Denominación del aislado	g/L de xilosa a las 43 h	g/L de etanol a las 43 h	g/L de xilosa a las 68 h	g/L de etanol a las 68 h	Nombre de la cepa
ninguno	ZW801-4	40,1	64,5	34,3	68,0	ZW801-4
F4B	NS-1302-2	24,9	72,7	20,3	75,2	ZW699
F1C	NS-1370	30,8	70,7	22,7	75,7	ZW702
F1C	NS-1369	42,8	62,5	33,7	67,8	ZW703
F4B	NS-1372	29,2	75,3	24,3	72,0	ZW704
F4B	NS-1373-1	26,3	73,9	12,4	80,5	ZW705
F4B	NS-1373-5	30,9	71,2	17,7	78,0	ZW706
F6	NS-1375	49,7	48,2	40,8	55,2	ZW707

5 A las 67 horas, todos los aislados excepto el NS-1375 utilizaron más xilosa, y todos los aislados excepto NS-1375 y NS-1369 produjeron más etanol que la cepa de partida ZW801-4 en las condiciones de cultivo de alto nivel de azúcar, alto nivel de acetato. Las cepas NS-1302-2, NS-1370, NS-1372, NS-1373-1, y NS-1373-5 utilizaron cada una al menos aproximadamente 10 g/L más de xilosa que ZW801-4. La cepa NS1373-1 fue renombrada ZW705 y se puso a prueba varias veces usando este mismo protocolo con ZW801-4 como cepa de comparación. ZW705 produjo consistentemente más etanol partiendo de hidrolizado de mazorca de maíz suplementado con azúcares. La razón principal para una mejor producción de etanol fue la utilización más completa de xilosa disponible. ZW705 utilizó consistentemente 99 a 100% de glucosa, utilizó 87 a 90% de xilosa disponible y produjo títulos de etanol de 80 a 85 g/L. En las mismas condiciones ZW801-4 utilizó aproximadamente 98% de glucosa, de 59 a 70% de xilosa y produjo títulos de etanol de 66 a 70 g/L.

Ejemplo 4

Evaluación de la cepa adaptada ZW705

15 Cultivos de ZW705 y ZW801-4 por lotes, como control, se hicieron crecer en matraces de 150 ml agitados, con pH y temperatura controlados. La temperatura inicial fue 30°C y varió a 27°C. El pH se mantuvo en 5,8. El medio fue mRM3 que contenía 10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 1,8 g/L de sorbitol. El medio se suplementó con acetato, glucosa y xilosa como se indica en la Tabla 3.

20 Después de 65,5 hr los cultivos se analizaron para la xilosa, glucosa, y etanol. Los resultados dados en la Tabla 3 muestran un aumento del 28% en la utilización de xilosa y un aumento del 18% en la producción de etanol mediante la cepa ZW705 adaptada en comparación con la cepa original ZW801-4.

Tabla 3. Utilización de glucosa y xilosa, y producción de etanol en la mejor cepa adaptada y cepa control.

Componente	Cepa	
	ZW801-4	ZW705
Acetato inicial g/L	10,67	10,63
Glucosa inicial g/L	110,03	109,7
Xilosa inicial g/L	91,83	91,64
Glucosa final g/L	0	0
Xilosa final g/L	25,9	0,14
Título de etanol g/L	77,57	91,94
Utilización de glucosa	100%	100%
Utilización de xilosa	72%	100%

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir una cepa de *Zymomonas* mejorada que utiliza xilosa que comprende
- a) proporcionar células de *Zymomonas* que utilizan xilosa;
  - b) crecimiento continuo de las células de *Zymomonas* que utilizan xilosa de (a) en un medio de cultivo de alimentación que comprende xilosa, con lo cual se produce un cultivo que comprende etanol;
  - c) añadir al cultivo de (b) una cantidad de amoníaco y ácido acético o acetato amónico con lo cual se produce un cultivo con estrés que comprende etanol y acetato amónico y en donde dicha adición da por resultado una concentración de acetato amónico de al menos 24 mM;
  - d) crecimiento continuo del cultivo con estrés de (c) a través del cual se producen células de *Zymomonas* mejoradas que utilizan xilosa; y
  - e) aislar una o más células del cultivo de (d) en donde al menos una o más células aisladas presentan mejor utilización de xilosa en presencia de acetato amónico y etanol en comparación con las células de *Zymomonas* proporcionadas de (a) que utilizan xilosa, y hacer crecer la célula mejorada como una cepa.
2. El método según la reivindicación 1 en donde la concentración de acetato amónico se aumenta al menos una vez durante la etapa (d).
3. El método de la reivindicación 1 en donde la xilosa en el medio de la parte (b) está a una concentración de al menos 50 g/L.
4. El método según la reivindicación 1 en donde en (b) el etanol es de al menos 18 g/L.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el periodo total de fermentación continua es dos meses o más.