

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 402**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

A01N 43/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2013 PCT/US2013/044909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13188262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2013 E 13729896 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2861747**

54 Título: **Uso de virginamicina para el control de la contaminación bacteriana en fermentaciones que utilizan Zymomonas mobilis**

30 Prioridad:

15.06.2012 US 201213524255

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

27.04.2017

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
Chestnut Run Plaza, 974 Center Road, P.O. Box
2915
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

**LEANA, MARIA, C. y
LEFEBVRE, BRIAN, G.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 610 402 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

Uso de virginiamicina para el control de la contaminación bacteriana en fermentaciones que utilizan *Zymomonas mobilis*

Campo de la invención

- 5 La invención está relacionada con los campos de la microbiología y la fermentación. Más específicamente, se desarrollaron métodos para controlar contaminantes en fermentaciones cuando se utiliza *Zymomonas* como el biocatalizador.

Antecedentes de la invención

- 10 El etanol combustible producido a partir de recursos renovables es una de las soluciones a largo plazo para las escaseces globales de combustible fósil, los incrementos del coste de la energía, y los efectos del calentamiento global relacionados con el incremento del dióxido de carbono atmosférico. Se produce etanol combustible a partir de recursos renovables mediante la fermentación de azúcares utilizando un biocatalizador. Actualmente la levadura es el biocatalizador más ampliamente utilizado para la producción de etanol. Los azúcares fermentables se obtienen habitualmente a partir de biomateriales procesados que incluyen granos de maíz, remolachas, y caña de azúcar. La biomasa celulósica o lignocelulósica es un biomaterial fuente de azúcar alternativo y abundante. Se están desarrollando métodos de procesamiento de biomasa celulósica y lignocelulósica para producir azúcares fermentables utilizando tratamientos físicos, químicos y/o enzimáticos.

- 15 Es difícil mantener la esterilidad en un proceso de fermentación a gran escala, particularmente cuando se usa biomaterial como una fuente de carbohidratos. Los procesos de fermentación a gran escala están típicamente contaminados con bacterias que pueden proceder del biomaterial procesado, del equipamiento, del agua del proceso o de otras fuentes. Típicamente las bacterias contaminantes son bacterias del ácido láctico (LAB) tales como especies de *Lactobacillus*. Las bacterias contaminantes reducen el rendimiento del producto de fermentación utilizando azúcares y reduciendo la efectividad del biocatalizador del producto primario. Las bacterias contaminantes producen productos indeseados tales como ácido acético y láctico, que aumentan las condiciones de estrés en un cultivo conduciendo a un crecimiento más pobre del biocatalizador y/o una menor producción del producto del biocatalizador.

- 20 Las bacterias contaminantes, predominantemente bacterias del ácido láctico, han sido un problema en fermentaciones que utilizan levadura como el biocatalizador, que utilizan típicamente malta remojada o melazas como fuente de carbohidratos para la producción de etanol tanto para combustible como para la elaboración de cerveza. Debido a las diferentes sensibilidades a algunos antimicrobianos de la levadura y de las bacterias contaminantes, se pueden utilizar una serie de antimicrobianos para controlar las bacterias en fermentaciones de levaduras. Los antimicrobianos que se han utilizado con éxito en fermentaciones de levaduras para controlar la contaminación de LAB incluyen penicilina (Day *et al.* (1954) *Agricultural and Food Chemistry* 2:252-258), virginiamicina (Hynes *et al.* (1997) *J. of Industrial Microbiology & Biotechnology* 18:284-291; Bischoff *et al.* (2009) *Biotechnology and Bioengineering* 103:117-122; WO2007145857), ácidos del lúpulo (US20090042276), FermaSure™, así como eritromicina, tilosina, y tetraciclina.

- 25 Se están desarrollando *Zymomonas* como un biocatalizador efectivo para producir etanol realizando mejoras en las cepas mediante manipulación genética, incluyendo la utilización de xilosa y arabinosa además de glucosa, e inactivando rutas metabólicas que compitan con la fermentación. Adicionalmente, se han adaptado *Zymomonas* para uso en un medio de fermentación hidrolizado incrementando la tolerancia a inhibidores presentes en el hidrolizado de biomasa celulósica. Sin embargo, utilizar *Zymomonas* como un biocatalizador para la fermentación de etanol presenta desafíos adicionales en el control de la contaminación ya que este biocatalizador es una bacteria, como lo son los contaminantes predominantes.

- 30 Las concentraciones de muchos antibióticos seguros para uso con levaduras inhiben el crecimiento de la cepa ZM4 de *Zymomonas mobilis*, incluyendo tetraciclina, kanamicina, polimixina y estreptomina (Agrawal y Basappa, *Biotechnology Letters* (1996) 18:673-678, Agrawal *et al.*, *J. of Fermentation and Biotechnology* (1994), 77(2):218-220). Se demostró que solamente la penicilina G es segura para uso con *Zymomonas*. Se utilizó con éxito bencilpenicilina para controlar la contaminación bacteriana en fermentación en lotes de *Zymomonas mobilis* para la producción de etanol (Grote y Rogers, *Journal of Fermentation Technology* (1985), 63:287-290). En otra revisión se describió *Zymomonas* como un contaminante de la sidra y la cerveza, y se encontraron cepas de *Zymomonas* con resistencia a niveles típicamente utilizados de algunos antibióticos incluyendo kanamicina, polimixina, y estreptomina (Swings y De Ley, *Bacteriological Reviews* (1977), 41:1-46). Las diferencias entre cepas pueden estar relacionadas con la codificación de resistencias en plásmidos, como se encontró para la estreptomina, la kanamicina, y la gentamicina en la cepa CP4 de *Z. mobilis* (Walia *et al.* (1984) *Applied and Environmental Microbiology* 47:198-200).

35 Siguen siendo necesarios métodos para controlar contaminantes bacterianos en fermentaciones que utilizan un biocatalizador bacteriano *Zymomonas* que ha sido desarrollado para la producción de etanol.

Compendio de la invención

La invención proporciona composiciones de caldos de fermentación y métodos para controlar la contaminación bacteriana en medios en donde el biocatalizador es *Zymomonas*.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición de caldo de fermentación comprendiendo:

- 5 a) un medio de fermentación;
 b) virginiamicina; y
 c) una población en crecimiento de células de *Zymomonas*.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para controlar la contaminación bacteriana en una fermentación que utiliza un biocatalizador *Zymomonas* comprendiendo:

- 10 a) proporcionar un medio de fermentación;
 b) añadir virginiamicina al medio de fermentación;
 c) añadir al medio de fermentación un inóculo de células de *Zymomonas*, produciendo de este modo un caldo de fermentación; y
 15 d) mantener el caldo de fermentación bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de las células de *Zymomonas*;

en donde las etapas b) y c) se pueden llevar a cabo en cualquier orden o de forma concurrente y en donde se controla la contaminación bacteriana.

En una realización se produce etanol en el caldo de fermentación de este método.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para producir etanol comprendiendo:

- 20 a) proporcionar un medio de fermentación;
 b) añadir al medio de fermentación un inóculo de células de *Zymomonas* que han crecido en presencia de virginiamicina produciendo un caldo de fermentación; y
 c) mantener el caldo de fermentación bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de células de *Zymomonas* y la producción de etanol por las células de *Zymomonas*;
 25 en donde se produce etanol.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para mejorar el crecimiento de células de *Zymomonas* comprendiendo hacer crecer células de *Zymomonas* en medio de fermentación comprendiendo virginiamicina.

Breve descripción de las figuras

30 La Figura 1 muestra un diagrama de la ruta de fermentación de etanol en *Zymomonas* manipuladas para la utilización de xilosa.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el crecimiento de la cepa ZW705 de *Z. mobilis* en hidrolizado MD07#3 clarificado suplementado con 2 g/L de extracto de levadura y Lactrol[®], Lactoside V[™], o Lactoside 247[™] a concentraciones diferentes, y un control.

35 La Figura 3 muestra gráficos de la concentración de ácido láctico (A) o etanol (B) en cultivos inoculados inicialmente con una proporción 1:100 de *Lactobacillus plantarum* : cepa ZW705 de *Z. mobilis*, en medio definido con 2 ppm de Lactrol[®] (F1068) o sin Lactrol[®] (F1067).

La Figura 4 muestra un gráfico de la utilización de glucosa en cultivos inoculados inicialmente con una proporción 1:100 de *Lactobacillus plantarum* : cepa ZW705 de *Z. mobilis*, en medio definido con 2 ppm de Lactrol[®] (F1068) o sin Lactrol[®] (F1067).

40 La Figura 5 muestra gráficos de la concentración de ácido láctico (A) o etanol (B) en medio hidrolizado inoculado con un cultivo iniciador inicialmente contaminado con una proporción 1:100 de *Lactobacillus plantarum* : cepa ZW705 de *Z. mobilis* y que ha crecido en un medio que no carece de virginiamicina (F1069) o que ha crecido en un medio que contiene 2 ppm de Lactrol[®] (F1070).

45 La Figura 6 muestra gráficos de la utilización de glucosa (A) y xilosa (B) en medio hidrolizado inoculado con un cultivo iniciador contaminado inicialmente con una proporción 1:100 de *L. plantarum* : cepa ZW705 de *Z. mobilis* y

que ha crecido en un medio que carece de virginiamicina (F1069) o que ha crecido en un medio que contiene 2 ppm de Lactrol® (F1070).

La Figura 7 muestra gráficos de la concentración de ácido láctico (A) o etanol (B) en cultivos que han crecido en medio hidrolizado que contiene diferentes concentraciones de Lactrol®, que se inocularon con un cultivo iniciador contaminado inicialmente con una proporción 1:100 de *L. plantarum* : cepa ZW705 de *Z. mobilis* y que ha crecido sin virginiamicina.

Descripción detallada

La invención está relacionada con el uso de un agente antimicrobiano para controlar bacterias contaminantes en fermentaciones que utilizan *Zymomonas* como el biocatalizador, tal como para la producción de etanol. El descubrimiento de que la virginiamicina es segura para las células de *Zymomonas* mientras controla las bacterias contaminantes de forma efectiva permite su uso en fermentaciones en las que el biocatalizador es *Zymomonas*. En particular, se ha encontrado que para el control efectivo de bacterias contaminantes en medios de fermentación que contienen hidrolizado de biomasa lignocelulósica se requieren niveles altos de virginiamicina, que son más altos que los niveles utilizados típicamente en fermentaciones para la producción de etanol mediante levaduras. Se pueden utilizar niveles altos en fermentaciones de *Zymomonas* sin una reducción en la producción de etanol. La producción eficiente de etanol a partir de recursos renovables, como el hidrolizado de biomasa celulósica, para uso como un aditivo para combustible abordará las escaseces de combustibles fósiles, reducirá los costes de la energía y afectará al calentamiento global.

Para la interpretación de las reivindicaciones y la especificación se deben utilizar las siguientes definiciones y abreviaturas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, “que tiene”, “contiene” o “que contiene”, o cualquier otra variación de los mismos, pretenden cubrir una inclusión no exclusiva. Por ejemplo, una composición, una mezcla, proceso, método, artículo, o aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente a solamente esos elementos pero puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicha composición, mezcla, proceso, método, artículo, o aparato. Además, excepto cuando se especifique expresamente lo contrario, “o” hace referencia a una “o” inclusiva y no a una “o” exclusiva. Por ejemplo, se satisface una condición A o B de cualquiera de las siguientes maneras: A es cierto (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es cierto (o está presente), y A y B son ambas ciertas (o están presentes).

También, los artículos indefinidos “un” y “una” que preceden a un elemento o componente de la invención pretenden ser no restrictivos respecto el número de casos (p. ej. ocurrencias) del elemento o componente. Por tanto se debe entender “un” y “una” como que incluye uno o al menos uno, y la forma de palabra singular del elemento o componente también incluye el plural excepto cuando el número indica obviamente que es singular.

El término “invención” o “presente invención” tal y como se utiliza en la presente memoria es un término no limitante y no pretende hacer referencia a ninguna realización de la invención particular, pero incluye todas las realizaciones posibles tal y como se describen en la especificación y las reivindicaciones.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “aproximadamente” que modifica la cantidad de un ingrediente o reactivo empleado en la invención hace referencia a la variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, durante los protocolos típicos de medida y de manipulación de líquidos utilizados para hacer concentrados o utilizar disoluciones en un contexto real; a través de errores inadvertidos en estos protocolos; a través de diferencias en la fabricación, fuente, o pureza de los ingredientes empleados para hacer las composiciones o llevar a cabo los métodos; y similares. El término “aproximadamente” también incluye cantidades que difieran debido a diferentes condiciones de equilibrio para una composición que resulta de una mezcla inicial particular. Las reivindicaciones incluyen equivalentes de las cantidades sin importar si están modificadas por el término “aproximadamente”. En una realización, el término “aproximadamente” quiere decir dentro del 10% de la cantidad numérica declarada, preferiblemente dentro del 5% de la cantidad numérica declarada.

El término “etanológeno” hace referencia a un organismo que produce etanol a través del metabolismo de fuentes de carbohidratos.

El término “azúcar(es) fermentable(s)” hace referencia a oligosacáridos y monosacáridos que se pueden utilizar como una fuente de carbono por un microorganismo en un proceso de fermentación.

El término “sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)” hace referencia a un proceso en donde se sacrifica la biomasa y un biocatalizador utiliza los azúcares fermentables producidos a partir de la sacarificación para producir un producto todo al mismo tiempo, típicamente en el mismo recipiente de reacción.

El término “celulósica” hace referencia a una composición que comprende celulosa y componentes adicionales que pueden incluir hemicelulosa y lignina.

El término “lignocelulósica” hace referencia a una composición que comprende tanto lignina como celulosa. El material lignocelulósico también puede comprender hemicelulosa.

El término “sacarificación” hace referencia a la producción de azúcares fermentables a partir de polisacáridos.

5 El término “biomaterial” hace referencia a cualquier material biológicamente derivado que es una fuente de carbohidratos que pueden ser utilizados en fermentación por un biocatalizador. Los biomateriales incluyen biomasa celulósica así como otros materiales vegetales y materiales derivados de plantas utilizados como fuentes de carbohidratos tales como granos, malta remojada, melazas, y zumo crudo (como el de remolachas y caña de azúcar).

10 El término “biomasa tratada previamente” significa biomasa que ha sido sometida a un tratamiento previo antes de la sacarificación.

15 El término “biomasa celulósica” hace referencia a cualquier material celulósico o lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa, y que comprenden opcionalmente además hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa celulósica también puede comprender componentes adicionales, tales como proteínas y/o lípidos. La biomasa celulósica puede derivar de una sola fuente, o puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente; por ejemplo, la biomasa celulósica puede comprender una mezcla de mazorcas de maíz y forraje de maíz, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa lignocelulósica incluye, pero no se limita a, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos urbanos, residuos sólidos industriales, lodo de la fabricación de papel, residuos de jardín, residuos de madera y forestales. Ejemplos de biomasa celulósica incluyen, pero no se limitan a, material vegetal de mazorcas de maíz, residuos de cultivos como cáscaras de maíz, forraje de maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, paja de cebada, heno, paja de arroz, panizo de pradera, hoja de palmera, racimos vacíos de frutos de palmera, papel desechado, bagazo de caña de azúcar, sorgo o soja, componentes celulósicos obtenidos del molido de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, arbustos y matorrales, verduras, frutas, flores y estiércol animal.

25 El término “hidrolizado de biomasa celulósica” hace referencia al producto que resulta de la sacarificación de biomasa celulósica o lignocelulósica. La biomasa también puede haberse tratado previamente antes de la sacarificación. El hidrolizado de biomasa celulósica es un producto que contiene sólidos de biomasa.

30 El término “hidrolizado de biomasa celulósica clarificado” o “hidrolizado de biomasa celulósica transparente” hace referencia a un hidrolizado de biomasa celulósica que ha sido procesado para eliminar sólidos y no se considera como hidrolizado de biomasa celulósica. Además, cualquier preparación que contenga azúcares derivados de biomasa celulósica.

El término “enzima sacarificante” hace referencia a una enzima que puede catalizar la conversión de un componente de la biomasa en azúcares fermentables. Típicamente, la enzima es más efectiva cuando la biomasa ha sido tratada previamente.

35 El término “contaminación sustancial” hace referencia a un nivel de bacterias del ácido láctico contaminantes en un caldo de fermentación que produciría más ácido láctico que un medio definido si el caldo de fermentación se incubara sin un antimicrobiano durante aproximadamente 40 horas.

40 El término “bacterias del ácido láctico” hace referencia a bacterias que producen ácido láctico como un producto final metabólico principal de la fermentación de carbohidratos. Las bacterias del ácido láctico (LAB) son bacterias gram positivas que pertenecen al orden *Lactobacillales*, y por ejemplo incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus*.

El término “medio de fermentación” hace referencia a una composición que comprende componentes, tales como nutrientes, que mantienen el crecimiento de un microorganismo utilizado como un biocatalizador. Se puede utilizar medio de fermentación de cualquier tamaño incluyendo cultivos a pequeña escala y fermentaciones de producción a gran escala.

45 El término “caldo de fermentación” hace referencia a una composición que comprende medio de fermentación y células de biocatalizador en el que está sucediendo o ha sucedido la fermentación. Dependiendo de cuánto tiempo ha estado creciendo el biocatalizador en el medio de fermentación, este caldo también puede incluir el producto producido por el biocatalizador, como etanol.

50 El término “cultivo iniciador” es un cultivo de células de biocatalizador que se utiliza para inocular un volumen mayor de medio de fermentación produciendo un caldo de fermentación. Un inóculo de cultivo iniciador es típicamente de aproximadamente el 0,01% al 20% en volumen del volumen final del caldo de fermentación.

55 El término “contaminación” hace referencia a la presencia de microorganismos que no se han introducido intencionadamente. Típicamente se introduce un biocatalizador deseado en un medio de crecimiento produciendo un caldo de fermentación. Otros microorganismos presentes en el caldo de fermentación además del biocatalizador introducido se consideran contaminaciones.

El presente método permite el control de bacterias indeseadas en cultivos donde una bacteria *Zymomonas* es el biocatalizador, tales como en la fermentación para la producción de etanol. Bacterias indeseadas y contaminantes están presentes típicamente en procesos a gran escala, particularmente cuando los medios contienen biomaterial procesado. El biomaterial procesado utilizado en medios puede incluir fuentes de carbohidratos tales como puré de maíz o trigo, melazas de remolacha o caña de azúcar, e hidrolizado de biomasa celulósica o lignocelulósica. Las bacterias contaminantes se pueden introducir en un proceso de fermentación a partir del biomaterial, equipamiento del proceso, cultivos de inoculación, agua del proceso, aire u otras fuentes. Controlar la contaminación en una fermentación de producción permite al biocatalizador crecer y producir producto a un mayor nivel que el que se consigue en la presencia de bacterias contaminantes, dando lugar a un proceso de fermentación más eficiente y económico.

Agente antimicrobiano para fermentaciones de *Zymomonas*

Como *Zymomonas* es una bacteria, para que un agente antimicrobiano se pueda utilizar en fermentaciones de *Zymomonas* debe dirigirse selectivamente a bacterias contaminantes sin afectar a las bacterias *Zymomonas*. Las bacterias del ácido láctico (LAB), tales como cepas de *Lactobacillus*, son las bacterias contaminantes predominantes en fermentaciones a gran escala que utilizan fuentes de carbohidratos derivadas de biomateriales. Las LAB son gram positivas mientras que *Zymomonas* es gram negativa. El desafío entonces fue identificar un agente antimicrobiano que controle LAB en medios de fermentación, sin afectar negativamente el crecimiento y producción de etanol de células de *Zymomonas*. Mediante este tipo de agente antimicrobiano se pueden controlar otras bacterias contaminantes además de LAB.

El presente método utiliza virginiamicina como un agente antimicrobiano selectivo en fermentaciones de *Zymomonas*. En la presente memoria se encuentra que la virginiamicina es segura para uso para controlar contaminación en cultivos de *Zymomonas*. La virginiamicina es producida por *Streptomyces virginiae* y está disponible comercialmente en diferentes preparaciones tales como Lactrol[®] (Phibro; Ridgefield Park, NJ) y Lactoside V[®] (Lallemand Ethanol Technology; Milwaukee, WI). Se recomienda Lactrol[®] para uso en fermentaciones de etanol en donde el biocatalizador es una levadura a 0,25 partes por millón (ppm) hasta 2,0 ppm, utilizando comúnmente 0,5 ppm. Las instrucciones del fabricante indican que la dosis no debería exceder 6,0 ppm durante la fermentación. Las especificaciones del Lactrol[®] indican que la preparación es actividad al 100%, indicando que 2 ppm de Lactrol[®] es equivalente a 2 ppm de virginiamicina. Se recomienda Lactoside V[®] para uso en fermentaciones de etanol en donde el biocatalizador es una levadura a 0,1 ppm hasta 3,0 ppm. Adicionalmente, Lactoside 247[™] (Lallemand Ethanol Technology; Milwaukee, WI) contiene virginiamicina combinada con penicilina G. Las instrucciones del fabricante recomiendan el uso en fermentaciones de etanol en donde el biocatalizador es una levadura a 1 hasta 2 ppm, potencialmente requiriendo mayores tasas para infecciones severas.

En un aspecto, en los presentes métodos se añaden virginiamicina y un inóculo de células de *Zymomonas* a un medio de cultivo produciendo un caldo de fermentación, el cual se mantiene bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de las células de *Zymomonas*. La virginiamicina y el inóculo se pueden añadir al medio en cualquier orden, o concurrentemente. Las presentes composiciones de caldo de fermentación comprenden medio de fermentación, virginiamicina, y una población en crecimiento de células de *Zymomonas* tal y como se describió anteriormente. Una vez se ha inoculado el medio de fermentación con células *Zymomonas* tales como células de una reserva congelada, células revividas de una reserva congelada, o células en un cultivo iniciador, las células de *Zymomonas* crecen dando lugar a una población en crecimiento de células de *Zymomonas*.

El medio de fermentación puede ser de cualquier tipo que mantenga el crecimiento y la producción de células de *Zymomonas*. Un experto en la técnica conocerá como preparar cualquiera de los tipos de medio descritos a la vista de la información que se detalla más adelante. En una realización, el medio de fermentación es un medio definido. Este medio contiene típicamente componentes comprados que incluyen una fuente de carbohidratos tal como glucosa, una fuente de aminoácidos y otros nutrientes tales como extracto de levadura, y otros componentes que pueden incluir elementos traza, nitrógeno, y fósforo tal como KH₂PO₄ y MgSO₄. A menudo se utiliza medio definido para hacer crecer cultivos a escala de laboratorio así como cultivos iniciadores que se utilizan como inóculo para fermentaciones a gran escala.

En otra realización, el medio de fermentación contiene azúcares obtenidos a partir de materiales no celulósicos tales como malta remojada, zumo crudo, o melazas. Estos azúcares se preparan a partir de biomateriales tales como granos de cereal (tales como maíz, trigo, cebada, y centeno), y cultivos azucareros tales como remolachas y caña de azúcar. La malta remojada hidrolizada que se utiliza para fermentación está hecha a partir de granos de cereal típicamente calentando hasta una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización, tratando con alfa amilasa para licuar, y sacarificando utilizando enzimas tales como la glucoamilasa. Se pueden utilizar melazas o zumos crudos de remolachas y caña de azúcar como la fuente de azúcar en un medio de fermentación. Este tipo de fuente de azúcar es una fuente de azúcar de biomaterial no celulósico (celulósico incluye lignocelulósico), ya que el almidón o zumo de azúcar es la principal fuente de azúcar. Este tipo de fuente de azúcar se utiliza típicamente en cultivos iniciadores y en la producción de etanol que utiliza levadura como el biocatalizador, y en otras fermentaciones no celulósicas a gran escala.

Los medios definidos y medios que contienen azúcar de una fuente no celulósica carecen de hidrolizado de biomasa celulósica (incluyendo lignocelulósica). Adicionalmente, se considera que un medio que contiene una fuente de azúcar obtenida a partir de biomasa celulósica, y que está altamente purificada para eliminar otros componentes celulósicos tales como sólidos, es un medio que carece de hidrolizado de biomasa celulósica. Este tipo de medio
5 contiene un hidrolizado de biomasa celulósica clarificado.

En todavía otra realización, el medio de fermentación contiene hidrolizado de biomasa celulósica preparado a partir de biomateriales celulósicos (incluyendo lignocelulósicos). El hidrolizado de biomasa celulósica contiene sólidos de biomasa. El hidrolizado de biomasa celulósica se produce mediante sacarificación de biomasa celulósica (incluyendo lignocelulósica). Típicamente, la biomasa se trata previamente antes de la sacarificación. Se puede tratar la biomasa
10 para producir azúcares fermentables en un hidrolizado mediante cualquier método conocido para un experto en la técnica. Típicamente, la biomasa se trata previamente utilizando tratamientos físicos y/o químicos, y se sacarifica enzimáticamente. Los tratamientos físicos y químicos pueden incluir pulverización, molido, cortado, tratamientos con bases tales como con amoníaco o NaOH, y/o tratamientos con ácidos. Un tratamiento previo de bajo amoníaco es particularmente útil, en donde la biomasa se pone en contacto con una disolución acuosa que comprende amoníaco
15 para formar una mezcla biomasa-amoníaco acuoso en donde la concentración de amoníaco es suficiente como para mantener un pH alcalino de la mezcla biomasa-amoníaco acuoso pero es menor que aproximadamente el 12% en peso en relación al peso seco de biomasa, y en donde el peso seco de biomasa es al menos aproximadamente 15% en peso de sólidos en relación con el peso de la mezcla biomasa-amoníaco acuoso, tal y como se describe en la patente de propiedad común US 7.932.063.

La sacarificación enzimática típicamente hace uso de una composición o mezcla enzimática para romper la celulosa y/o hemicelulosa y para producir un hidrolizado que contiene azúcares tales como, por ejemplo, glucosa, xilosa, y arabinosa. Las enzimas sacarificantes se revisan en Lynd, L. R. *et al.* (Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66:506-577, 2002). Se utiliza al menos una enzima, y típicamente se utiliza una mezcla de enzimas sacarificantes que incluye una o más glucosidasas. Las glucosidasas hidrolizan los enlaces éter de di-, oligo-, y polisacáridos y se encuentran en la
25 clasificación enzimática EC 3.2.1.x (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CA con Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), Suplemento 4 (1997) y Suplemento 5 [en Eur. J. Biochem., 223:1-5, 1994; Eur. J. Biochem., 232:1-6, 1995; Eur. J. Biochem., 237:1-5, 1996; Eur. J. Biochem., 250:1-6, 1997; y Eur. J. Biochem., 264:610-650, 1999, respectivamente]) del grupo general "hidrolasas" (EC 3.). Las glucosidasas que son útiles en el presente método se pueden categorizar por los componentes de la biomasa que hidrolizan. Las glucosidasas que son útiles para el presente método incluyen glucosidasas que hidrolizan celulosa (por ejemplo, celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, β-glucosidasas), glucosidasas que hidrolizan hemicelulosa (por ejemplo, xilanasas, endoxilanasas, exoxilanasas, β-xilosidasas, arabinoxilanasas, manasas, galactasas, pectinasas, glucuronidasas), y glucosidasas que hidrolizan almidón (por ejemplo, amilasas, α-amilasas, β-amilasas, glucoamilasas, α-glucosidasas, isoamilasas). Además, podría ser útil añadir otras actividades al
35 consorcio de enzimas sacarificantes tales como peptidasas (EC 3.4.x.y), lipasas (EC 3.1.1.x y 3.1.4.x), ligninasas (EC 1.11.1.x), o feruloil esterases (EC 3.1.1.73) para promover la liberación de polisacáridos de otros componentes de la biomasa. Se conoce en la técnica que los microorganismos que producen enzimas que hidrolizan polisacáridos muestran a menudo una actividad, tal como una capacidad de degradar celulosa, que está catalizada por muchas enzimas o un grupo de enzimas que tienen diferentes especificidades de sustrato. Por tanto, una "celulasa" de un microorganismo puede comprender un grupo de enzimas, de las cuales una o más o todas pueden contribuir a la actividad de degradación de celulosa. Preparaciones enzimáticas comerciales o no comerciales, tales como celulasas, pueden comprender numerosas enzimas dependiendo del esquema de purificación utilizado para obtener la enzima. Muchas enzimas glucosil hidrolasas y composiciones de las mismas que son útiles para sacarificación se describen en WO 2011/038019.

Se pueden obtener enzimas sacarificantes comercialmente. Dichas enzimas incluyen, por ejemplo, celulasa CP Spezyme[®], xilanasas Multifect[®], Accellerase[®] 1500, y Accellerase[®] DUET (Danisco U.S. Inc., Genencor International, Rochester, NY), y Novosyme-188 (Novozymes, 2880 Bagsvaerd, Dinamarca). Adicionalmente, las enzimas pueden estar sin purificar y se pueden proporcionar como un extracto celular o una preparación de células completas. Las enzimas se pueden producir utilizando microorganismos recombinantes que han sido manipulados para expresar una o más enzimas sacarificantes. Por ejemplo, la preparación de proteína H3A utilizada en la presente memoria para la sacarificación de biomasa celulósica tratada previamente es una preparación no purificada de enzimas producidas por una cepa manipulada genéticamente de *Trichoderma reesei*, que incluye una combinación de celulasas y hemicelulasas y que se describe en WO 2011/038019.

Las enzimas adicionales para sacarificación incluyen, por ejemplo, glucosil hidrolasas tales como miembros de las familias GH3, GH39, GH43, GH55, GH10, y GH11. Las GHs son un grupo de enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y una fracción no carbohidrato. Se han clasificado familias de GHs en base a la similitud de secuencia y la clasificación está disponible en la base de datos Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) (Cantarel *et al.* (2009) Nucleic Acids Res. 37 (número sobre bases de datos): D233-238). Algunas de estas enzimas son capaces de actuar sobre varios sustratos y han demostrado eficacia como enzimas sacarificantes. Las enzimas de la familia Glucósido hidrolasa 3 ("GH3") tienen varias actividades conocidas, incluyendo, por ejemplo, actividades β-glucosidasa (EC 3.2.1.21); β-xilosidasa (EC 3.2.1.37); N-acetil β-glucosaminidasa (EC 3.2.1.52); glucano β-1,3-glucosidasa (EC 3.2.1.58); celodextrinasa (EC 3.2.1.74); exo-1,3-1,4-glucanasa (EC 3.2.1); y/o β-galactosidasa (EC 3.2.1.23). Las enzimas de la familia Glucósido hidrolasa 39 ("GH39")
60

también tienen varias actividades conocidas incluyendo, por ejemplo, actividades α -L-iduronidasa (EC 3.2.1.76) y/o β -xilosidasa (EC 3.2.1.37). Las enzimas de la familia Glucósido hidrolasa 43 ("GH43") tienen varias actividades conocidas incluyendo, por ejemplo, actividades L- α -arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55); β -xilosidasa (EC 3.2.1.37); endoarabinanasa (EC 3.2.1.99); y/o galactano 1,3- β -galactosidasa (EC 3.2.1.145). Se sabe que las enzimas de la familia Glucósido hidrolasa 51 ("GH51") tienen, por ejemplo, actividades L- α -arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) y/o endoglucanasa (EC 3.2.1.4). La familia Glucósido hidrolasa 10 ("GH10") ha sido descrita en detalle en Schmidt *et al.*, 1999, *Biochemistry* 38:2.403-2.412 y Lo Leggio *et al.*, 2001, *FEBS Lett* 509: 303-308) y la familia Glucósido hidrolasa 11 ("GH11") ha sido descrita en Hakouvainen *et al.*, 1996, *Biochemistry* 35:9.617-24.

Los medios de fermentación que contienen hidrolizado de biomasa pueden contener un porcentaje de hidrolizado con uno o más azúcares adicionales y/u otros componentes añadidos, o los medios pueden contener un 90% o más hidrolizado con añadidos menores tales como sorbitol, tal y como se describió anteriormente. En varias realizaciones el hidrolizado de biomasa celulósica es al menos aproximadamente el 50%, 60%, 79%, 80%, 90% o 95% del volumen final del caldo de fermentación. Típicamente aproximadamente el 10% del volumen del volumen final del caldo de fermentación es inóculo iniciador.

El contenido de sólidos del hidrolizado de biomasa es típicamente entre aproximadamente el 10% y 40%, dependiendo de los métodos de tratamiento previo y sacarificación utilizados. Más típicamente, el contenido de sólidos es aproximadamente el 25%, con un medio que contiene el 90% de hidrolizado de biomasa celulósica que tiene aproximadamente el 23% de sólidos.

Concentraciones de virginiamicina utilizadas en caldos de fermentación

En la presente memoria se encontró que la concentración de virginiamicina que es necesaria para controlar la contaminación en un caldo de fermentación de *Zymomonas* varía, dependiendo de si el medio de fermentación contiene hidrolizado de biomasa celulósica. En la presente memoria se ha encontrado que en un caldo de fermentación cuya composición contiene medios que carecen de hidrolizado de biomasa celulósica (descritos anteriormente), una concentración de aproximadamente 2 ppm de virginiamicina controla las bacterias contaminantes sin afectar a la utilización de glucosa y la producción de etanol de células de *Zymomonas*. La concentración de virginiamicina en el presente caldo de fermentación cuya composición carece de hidrolizado de biomasa celulósica puede ser al menos aproximadamente de 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 10 ppm, o 20 ppm, incluyendo cualquier número entero o fracción entre ellos. Realizaciones típicas utilizan virginiamicina a concentraciones que están entre aproximadamente 0,25 ppm y 20 ppm. Realizaciones más típicas utilizan virginiamicina a concentraciones que están entre aproximadamente 1,0 ppm y 10 ppm. La cantidad de virginiamicina necesaria para controlar la contaminación depende de factores tales como la cantidad de contaminación, el tipo de medio, la concentración de células de *Zymomonas* después de la inoculación, y las condiciones de fermentación, y puede ser determinada por un experto en la técnica para una situación específica.

Se puede evaluar el control de bacterias contaminantes determinando el nivel de ácido láctico en el caldo de fermentación, donde la presencia de menos de aproximadamente 5 g/L de ácido láctico tras aproximadamente 40 horas de fermentación indica que la contaminación está controlada. Se puede controlar la contaminación a menos de aproximadamente 5 g/L de ácido láctico en el caldo de fermentación, o menos de 4 g/L o 3 g/L o 2 g/L o 1 g/L de ácido láctico. La cantidad de ácido láctico en el caldo de fermentación se determina típicamente mediante HPLC, tal y como conoce un experto en la técnica.

En la presente memoria se encontró que, en medios que carecen de hidrolizado de biomasa celulósica y que contienen 2,5 ppm o 5 ppm de virginiamicina, el crecimiento de células de *Zymomonas* medido mediante OD₆₀₀ era mejor que el crecimiento de las células en ausencia de virginiamicina. En una realización, el crecimiento de células de *Zymomonas* mejora haciendo crecer las células en un medio comprendiendo virginiamicina. El crecimiento mejorado puede contribuir a reducir el nivel de contaminación a través de la competición, y/o a aumentar la producción de etanol. La concentración utilizada para mejorar el crecimiento depende de factores tales como el tipo de medio utilizado, la concentración de células de *Zymomonas* después de la inoculación, y las condiciones de fermentación. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la concentración de virginiamicina que estimula el crecimiento de células de *Zymomonas* cuando se utiliza un medio y un conjunto de condiciones de fermentación específicas. Por ejemplo, en medio de hidrolizado de biomasa celulósica clarificado bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 1 de la presente memoria, concentraciones de virginiamicina de 2,5 ppm y 5 ppm mejoraron el crecimiento de células de *Zymomonas*. En otras fermentaciones, se puede mejorar el crecimiento de células de *Zymomonas* mediante la presencia de virginiamicina a concentración en el rango de aproximadamente 1 ppm a por encima de aproximadamente 50 ppm, o más.

En la presente memoria se ha encontrado que cuando se controla la contaminación presente en un cultivo iniciador utilizando virginiamicina (tal y como se describió anteriormente), y el cultivo iniciador se utiliza para inocular una fermentación a mayor escala, la contaminación sigue estando controlada en la fermentación a gran escala sin añadir virginiamicina ni otro agente antimicrobiano al medio de fermentación de forma separada del inóculo. Por tanto, en una realización, se controla la contaminación de una fermentación mediante la inclusión de virginiamicina en un cultivo iniciador que se utiliza para inocular el medio de fermentación. El medio de fermentación puede contener hidrolizado de biomasa celulósica, o puede carecer de hidrolizado de biomasa celulósica. En un cultivo iniciador que

ha crecido en un medio que carece de hidrolizado de biomasa celulósica, la concentración de virginiamicina puede ser la que se describió anteriormente: al menos aproximadamente 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 10 ppm, o 20 ppm, incluyendo cualquier número entero o fracción entre ellos. Realizaciones típicas utilizan virginiamicina a concentraciones que están entre aproximadamente 0,25 ppm y 20 ppm.

5 Realizaciones más típicas utilizan virginiamicina a concentraciones que están entre aproximadamente 1 ppm y aproximadamente 5 ppm.

Sin embargo, cuando no se controla la contaminación en un cultivo iniciador, la contaminación es un factor en una fermentación a gran escala que se inocula con el cultivo iniciador contaminado. En una realización, la contaminación en la fermentación contaminada inoculada a partir de un iniciador se controla tal y como se describió anteriormente cuando utiliza un medio que carece de hidrolizado de biomasa celulósica.

10

En la presente memoria se ha encontrado que en caldos de fermentación que contienen medios que contienen hidrolizado de biomasa celulósica, se puede utilizar una concentración de virginiamicina de al menos aproximadamente 10 ppm para controlar bacterias contaminantes manteniendo mientras tanto una producción de etanol típica por parte de células de *Zymomonas* (aproximadamente 70 a 80 g/L para la cepa de *Zymomonas* utilizada en la presente memoria). En varias realizaciones del presente caldo de fermentación cuya composición contiene hidrolizado de biomasa celulósica, la concentración de virginiamicina en el caldo de fermentación es al menos de aproximadamente 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, o 250 ppm, incluyendo cualquier número entero o fracción entre ellos. En la presente memoria se ha encontrado que se consigue una buena producción de etanol por parte de células *Zymomonas* en caldos de fermentación contaminados inoculados a partir de un iniciador comprendiendo un medio que contiene hidrolizado de biomasa celulósica y concentraciones de virginiamicina entre 10 ppm hasta 250 ppm. La presencia relativamente alta de sólidos en el medio que contiene hidrolizado de biomasa celulósica puede contribuir al requerimiento de niveles superiores de virginiamicina necesarios para controlar la contaminación comparados con los niveles que son efectivos en medio que carece de hidrolizado de biomasa celulósica. También puede contribuir la presencia de varios productos de degradación de la biomasa en el hidrolizado. Los niveles altos de virginiamicina son mayores que aquellos recomendados por los fabricantes de productos de virginiamicina para uso en producción de etanol con levaduras.

15

20

25

En cualquier tipo de medio utilizado para fermentación, los resultados específicos del control de la contaminación dependerán de factores que incluyen las características de crecimiento y producción de la cepa de *Zymomonas* utilizada, los microorganismos contaminantes presentes, el nivel de contaminación inicial, el tipo y cantidad de hidrolizado de biomasa celulósica en el medio (incluye el porcentaje de sólidos y la toxicidad de subproductos para las células contaminantes y de *Zymomonas*) si está presente, y las condiciones de cultivo que incluyen el mezclado. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la concentración de virginiamicina en relación con las cantidades descritas en la presente memoria que es efectiva controlando la contaminación en un caldo de fermentación de *Zymomonas* utilizando condiciones de fermentación específicas, manteniendo mientras tanto la productividad de las células de *Zymomonas*.

30

35

Inóculo de células de *Zymomonas*

En el presente método, el inóculo de células de *Zymomonas* puede ser cualquier fuente de células de *Zymomonas* que es efectiva en iniciar un cultivo en crecimiento. Típicamente, las células de *Zymomonas* se almacenan como reservas congeladas, y las células se reviven haciéndolas crecer en un cultivo pequeño en medio definido. Se utiliza el cultivo pequeño como un inóculo que se añade al medio de fermentación para producir un caldo o cultivo de fermentación. También se puede utilizar un cultivo pequeño para inocular un cultivo iniciador. Se hacen crecer células de *Zymomonas* en el cultivo iniciador, que se añade entonces como un inóculo a una fermentación a mayor escala. Un cultivo iniciador utilizado como un inóculo puede contener medio definido estéril sin que se necesite virginiamicina para controlar la contaminación. Alternativamente, un cultivo iniciador utilizado como un inóculo puede contener medio definido u otro medio que carezca de hidrolizado de biomasa celulósica, tal como medio preparado a partir de malta remojada o melazas, que puede estar contaminado tal como por medio del equipamiento de proceso, donde se añade virginiamicina para controlar la contaminación tal y como se describió anteriormente. Adicionalmente, un cultivo iniciador utilizado como un inóculo puede contener hidrolizado de biomasa celulósica y virginiamicina para controlar la contaminación tal y como se describió anteriormente.

40

45

Células de *Zymomonas*

50

Se puede utilizar cualquier cepa de células de *Zymomonas* en las presentes composiciones y métodos, y se selecciona en base a factores que incluyen el tipo de medio a utilizar y el resultado deseado del proceso de fermentación. Se puede utilizar cualquier cepa de *Zymomonas* que sea un biocatalizador efectivo para el proceso de producción deseado. Por ejemplo, las células de *Zymomonas* producen naturalmente etanol utilizando glucosa, fructosa y/o sacarosa como sustratos de fermentación, pero no se metaboliza la xilosa. En una realización, las células de *Zymomonas* utilizadas en los presentes métodos y composiciones han sido manipuladas para la utilización de xilosa, que es particularmente deseable cuando se utiliza hidrolizado de biomasa celulósica, que contiene xilosa.

55

Se han manipulado cepas de *Zymomonas* productoras de etanol, tales como *Z. mobilis*, para la fermentación de xilosa en etanol. Típicamente se han introducido cuatro genes en *Z. mobilis* para la expresión de cuatro enzimas implicadas en el metabolismo de xilosa para crear una ruta metabólica de utilización de xilosa (Figura 1) tal y como se describió en la patente de EEUU nº 5.514.583, en la patente de EEUU nº 5.712.133, la patente de EEUU nº 6.556.107, WO 95/28.476, Feldmann *et al.* ((1992) Appl Microbiol Biotechnol 38: 354-361), y Zhang *et al.* ((1995) Science 267:240-243). Éstos incluyen genes que codifican la xilosa isomerasa que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa, y la xilulokinasa que fosforila xilulosa para formar xilulosa 5-fosfato. Se expresan adicionalmente la transcetolasa y la transaldolasa, dos enzimas de la ruta del metabolismo de pentosas que convierten xilulosa 5-fosfato en intermediarios que acoplan el metabolismo de pentosas con la ruta glucolítica Entner-Doudoroff permitiendo el metabolismo de xilosa en etanol (ver Figura 1). Se pueden obtener las secuencias de DNA que codifican estas enzimas de cualquiera de los muchos microorganismos que son capaces de metabolizar xilosa, tales como bacterias entéricas, y algunas levaduras y hongos. Fuentes de las regiones codificantes pueden incluir *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhodobacter*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonads*, y *Zymomonas*. Se utilizan típicamente las regiones codificantes de *E. coli*.

Las secuencias de DNA codificantes se unen de forma operable a promotores que se expresan en células de *Zymomonas* tales como el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (promotor GAP) de *Z. mobilis*, y de la enolasa (promotor ENO) de *Z. mobilis*. En US 7.989.206 se describe un promotor GAP mutante con expresión aumentada que también es útil para expresión en *Zymomonas*. Las regiones codificantes se pueden expresar individualmente a partir de promotores, o se pueden unir dos o más regiones codificantes en un operón con expresión a partir del mismo promotor. Los genes quiméricos resultantes se pueden introducir en células de *Zymomonas* y se pueden mantener en un plásmido, o se pueden integrar en el genoma utilizando, por ejemplo, recombinación homóloga, integración dirigida, o integración aleatoria. Ejemplos de cepas manipuladas para expresar una ruta metabólica de utilización de xilosa incluyen CP4(pZB5) (US 5.514.583), ATCC31821/pZB5 (US 6.566.107), 8b (US 20030162271; Mohagheghi *et al.*, (2004) Biotechnol. Lett. 25: 321-325), y ZW658 (ATCC # PTA-7858). Las células de *Zymomonas* que han sido manipuladas para expresar la ruta metabólica de utilización de xilosa requieren generalmente un periodo de adaptación en medio que contiene xilosa antes de ser capaces de crecer en un medio que contiene xilosa como único azúcar.

En realizaciones adicionales, la células de *Zymomonas* tienen una o más modificaciones genéticas adicionales que mejoran la cepa tales como una que incrementa la tasa de crecimiento y/o la masa celular, incrementa la utilización de xilosa y/o permite la utilización de otros azúcares tales como la arabinosa, incrementa la tolerancia a compuestos inhibidores tales como el acetato, o incrementa la producción de etanol.

En una realización las células de *Zymomonas* pueden manipularse adicionalmente para la utilización de arabinosa, lo que se describe en US 5.843.760, y que se incorpora por referencia en la presente memoria. Para permitir la utilización de arabinosa, los genes expresados además de los genes para la ruta de utilización de xilosa incluyen: 1) L-arabinosa isomerasa para convertir L-arabinosa en L-ribulosa, 2) L-ribulokinasa para convertir L-ribulosa en L-ribulosa-5-fosfato, y 3) L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa para convertir L-ribulosa-5-fosfato en D-xilulosa (US 5.843.760). Tal y como se describe en US 2011/0143408 se puede conseguir una mejor utilización de arabinosa expresando adicionalmente un simportador arabinosa-protón, tal como expresando una región codificante de un gen araE.

En otra realización, el gen *himA* endógeno, que codifica la subunidad alfa del factor de integración del hospedador, se modifica genéticamente para reducir su expresión lo que mejora el crecimiento en medio que contiene acetato tal y como se describe en US 7.897.396. El acetato está presente en el hidrolizado de biomasa, por tanto cuando se utiliza medio que contiene hidrolizado de biomasa se desea un incremento de la tolerancia hacia este componente.

En otra realización, se realiza una modificación genética que reduce la actividad glucosa-fructosa oxidoreductasa (GFOR) tal y como se describe en US 7.741.119. La reducción de la expresión de GFOR, así como del gen *himA*, puede realizarse mediante cualquier método tal como los descritos anteriormente para reducir la actividad aldosa reductasa.

En otra realización, se realiza una modificación genética que aumenta la actividad ribosa-5-fosfato isomerasa (RPI), tal y como se describe en la solicitud de patente provisional de EEUU, de propiedad común y en tramitación con la presente, nº 13/161.734. Se puede conseguir una expresión incrementada de RPI incrementando la expresión del gen endógeno codificante de la RPI, tal como con un promotor que es más altamente activo que el promotor nativo, o expresando un gen heterólogo que codifica cualquier proteína o polipéptido con actividad ribosa-5-fosfato isomerasa en *Zymomonas*. Hay dos grupos de enzimas ribosa-5-fosfato isomerasas llamados RPI-A y RPI-B, tal y como se describe en la solicitud de patente provisional de EEUU nº 13/161.734, y se puede expresar cualquiera de las dos.

En otra realización, la xilosa isomerasa que se expresa como parte de la ruta metabólica de utilización de xilosa se expresa utilizando un promotor mutante y altamente activo que se describe en US 7.989.206 y US 7.998.722. Los promotores mutantes descritos en dichas referencias son promotores del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis*.

En otra realización, una xilosa isomerasa que se expresa como parte de la ruta metabólica de utilización de xilosa es una xilosa isomerasa del Grupo I incluida en la clase de enzimas descrita por EC 5.3.1.5 y descritas en la publicación de patente provisional de EEUU, de propiedad común y en tramitación con la presente, US 2011-0318801. En dicha referencia se describe que las isomerasas del Grupo I, tales como una expresada a partir de una región codificante aislada de *Actinoplanes missouriensis* tienen mayor actividad en *Zymomonas* que isomerasas del Grupo 2. En dicha referencia se definen las isomerasas del Grupo I mediante análisis bioinformáticos de filogenia molecular (utilizando el algoritmo de unión de vecinos PHYLIP tal y como se implementa en PHYLIP (Phylogeny Inference Package versión 3,5c; Felsenstein (1989) Cladistics 5:164-166), análisis GroupSim (Capra and Singh (2008) Bioinformatics 24: 1.473-1.480), y un Perfil de Modelo Oculto de Markov (utilizando el algoritmo hmmsearch del paquete de software HMMER; Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA).

En otra realización, se han adaptado las células de *Zymomonas* para el crecimiento en un cultivo de estrés que contiene etanol y acetato de amonio, tal y como se describe en la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2011-0014670-A1. Esas cepas de *Zymomonas* con tolerancia mejorada al acetato son particularmente útiles cuando se utiliza hidrolizado de biomasa celulósica que contiene medio de fermentación, que contiene acetato.

Las cepas descritas en las referencias anteriores proporcionan ejemplos de cepas que se pueden utilizar en los presentes métodos y métodos e incluyen ATCC31821/pZB5, ZW658 (ATCC #PTA-7858), ZW800, ZW801-4, ZW801-4::ΔhimA, AcR#3, y ZW705.

Fermentación de *Zymomonas*

En el presente método, el medio de cultivo inoculado, o caldo de fermentación, se incuba bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de células de *Zymomonas*. En una realización las células de *Zymomonas* son de una cepa de *Zymomonas* que es un biocatalizador efectivo para la producción de etanol bajo las condiciones utilizadas en fermentación, y se produce etanol en el caldo de fermentación. Cuando la concentración de azúcares en el medio de fermentación es tan alta como para inhibir el crecimiento, el medio incluye sorbitol, manitol, o una mezcla de los mismos tal y como se describe en la patente de EEUU de propiedad común nº 7.629.156. Típicamente, en el medio está presente una concentración final de aproximadamente 5 mM de sorbitol o manitol.

Típicamente se utilizan condiciones con una temperatura que es entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C, y un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5. Típicamente los cultivos se incuban sin suplementar aire, oxígeno u otros gases (que podrían incluir condiciones tales como fermentación anaeróbica, microaeróbica, o microaerófila), durante al menos aproximadamente 20 horas, y puede hacerse funcionar durante aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 horas, o más. Típicamente los cultivos iniciadores se incuban durante aproximadamente 20 horas, mientras que los cultivos de producción de fermentación se incuban durante aproximadamente 40 horas o más. Para minimizar la formación de espuma, se pueden añadir al medio agentes antiespumantes (cualquier clase a base de silicona, a base de compuestos orgánicos, etc.) si se necesitan.

Para cultivos de fermentación de producción comercial, se pueden aplicar una serie de metodologías de cultivo. Por ejemplo, para la producción a gran escala se pueden utilizar metodologías de cultivo tanto en lotes como en continuo. Un método clásico de cultivo en lotes es un sistema cerrado donde la composición del medio se fija al comienzo del cultivo y no está sujeta a alteraciones artificiales durante el proceso de cultivo. Por tanto, al comienzo del proceso de cultivo se inocula el medio con el organismo deseado y se permite que ocurra el crecimiento o la actividad metabólica sin añadir nada al sistema. Típicamente, sin embargo, un cultivo "en lotes" es en lotes respecto a la adición de una fuente de carbono y a menudo se hacen intentos para controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En sistemas en lote las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en el que finaliza el cultivo. En los cultivos en lote las células pasan de una fase de latencia a una fase logarítmica de gran crecimiento y finalmente a una fase estacionaria donde la tasa de crecimiento se disminuye o para. Si no se tratan, las células en fase estacionaria finalmente morirán. Las células en fase logarítmica son a menudo responsables de la mayor parte de la producción de etanol.

El sistema en lote-alimentado es una variación del sistema en lote estándar. Los sistemas de cultivo en lote-alimentado también son adecuados para los presentes métodos y composiciones, y comprenden un sistema en lote típico con la excepción de que se añade el sustrato en pequeñas cantidades mientras progresa el cultivo. La medida de la concentración real de sustrato en sistemas en lotes-alimentados es difícil y por tanto se estima en base a los cambios de factores medibles tales como el pH y la presión parcial de gases residuales tales como el CO₂. Los métodos de cultivo en lotes y en lotes-alimentados son comunes y conocidos en la técnica, y se pueden encontrar ejemplos en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Crueger, Crueger, and Brock, Segunda Edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, o Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36, 227, (1992).

Los presentes métodos y composiciones también se pueden utilizar en un proceso de cultivo continuo. Los cultivos continuos son sistemas abiertos donde se añade el medio de cultivo continuamente a un biorreactor y se elimina simultáneamente una cantidad igual de medio condicionado para procesar. Los cultivos continuos mantienen generalmente las células a una alta densidad de fase líquida donde las células están principalmente en crecimiento en fase logarítmica. Alternativamente, se puede practicar un cultivo continuo con células inmovilizadas donde se

añaden continuamente carbono y nutrientes, y se eliminan continuamente de la masa de células productos valiosos, subproductos o productos residuales. Tal y como conoce un experto en la técnica, la inmovilización celular se puede llevar a cabo utilizando una gran variedad de soportes sólidos compuestos por materiales naturales y/o sintéticos.

5 En un proceso de producción, los cultivos de fermentación de producción se realizan uno tras otro hasta que se necesita una limpieza del sistema.

Los presentes métodos y composiciones también se pueden utilizar en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). Por ejemplo, se puede utilizar el proceso descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de EEUU 2011-0318803. En este proceso de SSF, las células de *Zymomonas* se hacen crecer bajo condiciones de baja agitación con alta concentración de sólidos insolubles en una mezcla de sacarificación-fermentación durante una reacción de sacarificación y fermentación simultánea para la producción de altas concentraciones de etanol. Adicionalmente, se puede utilizar un proceso de sacarificación y fermentación híbridas (HSF) en el que se lleva a cabo una sacarificación parcial antes de añadir las células de *Zymomonas*, entonces simultáneamente ocurren más sacarificación y fermentación.

Ejemplos

15 La presente invención se define además en los siguientes Ejemplos. Se debe entender que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, solo se proporcionan a modo de ilustración.

El significado de las abreviaturas es como sigue: "h" 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), "OD600" significa densidad óptica medida a 600 nm, "EFT" significa tiempo de fragmentación transcurrido, "ppm" significa partes por millón.

Métodos generales

Descripción de la cepa ZW705

25 La cepa de *Zymomonas mobilis* ZW705 se produjo a partir de la cepa ZW804-1. La cepa ZW801-4 es una cepa recombinante que utiliza xilosa que fue descrita en la Patente de EEUU de propiedad común N° US 7.741.119, que se incorpora por referencia en la presente memoria. La cepa ZW801-4 se derivó de la cepa ZW800, que se derivó de la cepa ZW658, todo tal y como se describe en la Patente de EEUU US 7.741.119. Se construyó ZW658 integrando dos operones, $P_{gap}xyIA B$ y $P_{gap}tal tkt$, que contienen cuatro genes de utilización de xilosa que codifican xilosa isomerasa, xilulokinasa, transaldolasa y transcetolasa, en el genoma de ZW1 (ATCC 31821) mediante eventos de transposición secuencial, y seguidos de adaptación en medio selectivo que contenía xilosa (US 7.629.156). ZW658 se depositó como ATCC PTA-7858. En ZW658, el gen que codifica la glucosa-fructosa oxidoreductasa se inactivó mediante inserción utilizando recombinación homóloga de doble entrecruzamiento mediada por el hospedador y la resistencia a espectinomicina como marcador de selección para crear ZW800 (US 7.741.119). Se eliminó el marcador de resistencia a espectinomicina, que estaba acotado por sitios loxP, mediante recombinación específica de sitio utilizando recombinasa Cre para crear ZW801-4.

Se adaptaron cultivos de la cepa ZW801-4 de *Z. mobilis* para crecimiento bajo las condiciones de estrés de un medio que contenía acetato de amonio para producir ZW705, tal y como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EEUU 2011-0014670, que se incorpora por referencia en la presente memoria. Se realizó un cultivo continuo de ZW801-4 en fermentadores agitados de 250 ml, con pH y temperatura controlados (Sixfors; Bottmingen, Suiza). El medio basal para fermentación fue 5 g/L de extracto de levadura, 15mM de fosfato de amonio, 1 g/L de sulfato de magnesio, 10mM de sorbitol, 50 g/L de xilosa y 50 g/L de glucosa. Se efectuó una adaptación al crecimiento en presencia de altas concentraciones de acetato y amoníaco incrementando gradualmente la concentración de acetato de amonio añadido a los medios de cultivo continuos anteriores, manteniendo mientras tanto una tasa establecida de crecimiento, medida a través de la tasa de disolución específica, durante un periodo de 97 días. Se incrementó el acetato de amonio a una concentración de 160mM. Se consiguieron más incrementos de la concentración de iones de amonio añadiendo fosfato de amonio hasta una concentración total de amonio final de 210mM al final de 139 días de cultivo continuo. Se aisló la cepa ZW705 a partir de la población adaptada cultivando colonias aisladas en placas y amplificando una colonia escogida.

50 Composición de las mazorcas

Se determinó la cantidad de celulosa y xilano en las mazorcas iniciales de maíz utilizando el método ASTM E1.758-01 "Standard method for the determination of carbohydrates by HPLC" tal y como se detalla en National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) Technical Report NREL/TP-510-42.618 (revisado en Abril de 2008). Su composición determinada basada en peso seco fue 34,8% celulosa, 29,2% xilano, 12,8% lignina.

55

Enzimas sacarificantes

La Celulasa CP Spezyme® y Multifect®-CX12L eran de Danisco U.S. Inc., Genencor International, Rochester, NY, Novozyme-188 era de Novozymes (2880 Bagsvaerd, Dinamarca).

Proteína H3A

5 Se preparó proteína H3A a partir de la cepa manipulada genéticamente H3A de *Trichoderma reesei*. Se preparó la cepa H3A tal y como se describe en US 7.666.648. Brevemente, una cepa mutante de *Trichoderma reesei*, derivada de RL-P37 (Sheir-Neiss, G *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20:46-53) y seleccionada por la alta producción de celulasa se transformó conjuntamente con un casete de expresión de β -glucosidasa y un casete de expresión de endoxilanasas utilizando electroporación. Un transformante se denominó #229. La cepa #229 se transformó
10 conjuntamente con un casete de expresión de β -xilosidasa Fv3A, un casete de expresión de β -xiosidasa Fv43D, y un casete de expresión de α -arabinofuranosidasa Fv51A utilizando electroporación. La cepa H3A se aisló de esta etapa de transformación.

Se separaron proteínas extracelulares producidas durante la fermentación de la cepa H3A de la masa celular mediante centrifugación, se concentraron mediante ultrafiltración en membrana a través de una membrana Millipore con límite de peso molecular de 10 kD, y se ajustó el pH a 4,8. Se determinó la proteína total utilizando un método de Biuret modificado, tal y como fue modificado por Weichselbaum y Gornall utilizando Albúmina de Suero Bovino como un calibrador (Weichselbaum, 1960, Amer. J. Clin. Path. 16:40; Gornall *et al.*, 1949 J. Biol. Chem 177:752). Esta preparación de proteína extracelular de H3A, también denominado en la presente memoria como proteína H3A, se utilizó como preparación mezcla de celulasas y hemicelulasas que efectúan la hidrólisis de carbohidratos complejos durante la SSF.
15
20

Hidrolizado de mazorcas FRF13

Tratamiento previo

El hidrolizado de mazorcas de maíz se preparó primero mediante un tratamiento previo de las mazorcas de maíz molidas con amoníaco diluido utilizando métodos de bajo amoníaco descritos en US 7.932.063. Para el tratamiento previo para generar mazorcas tratadas previamente denominadas SSL34, se utilizó un recipiente reactor horizontal de 130 L Littleford Day que contiene una camisa para hacer pasar vapor alrededor del cuerpo del recipiente (Littleford Day, Inc., Florence, KY). El recipiente se cargó con mazorcas procedentes del procesamiento de semillas de maíz para alcanzar un 46% en volumen de la capacidad del reactor en base a mazorcas húmedas (23,1 Kg, 51 lbs). Se habían reducido las mazorcas a un tamaño menor que 1 mm utilizando un gran micropulverizador (Modelo #1SH, Serie #10019; Pulverizing Machinery Co., Summit, NJ) con un tamiz de 1,0 mm. Se añadió una cucharada pequeña de hielo seco a las mazorcas antes del molido, necesaria para prevenir el calentamiento del equipamiento. El principal impulsor del micropulverizador es un motor de 5 CV, con una velocidad de rotor máxima de 9.600 rpm. Tiene seis martillos rotativos, una carcasa, y está equipada con cuchillas de impacto opuestas.
25
30

Las mazorcas tenían una densidad aparente suelta de 0,385 g/cm³ y un 7,4% en peso de humedad. Se aplicó vacío al recipiente para alcanzar 10.132,5 Pa (0,1 atm) antes de la introducción de una disolución de hidróxido de amonio al 28,9% en peso (4,4 Kg, 9,8 lbs) y agua (8,2 Kg, 17,9 lbs) cerca de la parte superior del recipiente para dar lugar a un 6% en peso de NH₃ en relación al peso seco de biomasa y un 60% en peso de sólidos dentro del recipiente. Se llevaron a cabo un segundo y tercer lotes de tratamiento previo, denominados SSL35 y SSL36, de la misma manera para generar suficiente material para la sacarificación subsecuente. En todos los lotes, se fijó la agitación del reactor a 70 rpm y se hizo pasar vapor a través de la camisa del recipiente. Cuando el reactor alcanzó una temperatura interna de 80°C se introdujo vapor cerca de la parte superior del recipiente para aumentar la temperatura interna del recipiente a 145°C. Se mantuvo esta temperatura durante 20 minutos. A los 15 minutos de este tiempo de espera se detuvo el flujo de vapor a través de la camisa. Al final del tratamiento previo, se despresurizó el recipiente a través de un condensador de ventilación para alcanzar presión atmosférica. Subsecuentemente se aplicó vacío (aproximadamente hasta menos de 101.325 Pa (1 atm)) durante 15 minutos para disminuir la temperatura hasta menos de 60°C y eliminar amoníaco y agua adicionales de las mazorcas tratadas previamente antes de abrir la válvula inferior del recipiente y recuperar la biomasa tratada previamente. El porcentaje en peso de sólidos de los lotes de mazorcas de maíz tratadas previamente SSL34, SSL35 y SSL36 fue 67,4%, 66,2% y 68,0%, respectivamente.
35
40
45

50 Sacarificación

Se generó un hidrolizado (FRF13) en un fermentador de 200 L utilizando una mezcla de las mazorcas de maíz tratadas previamente de las preparaciones SSL34, SSL35 y SSL36 mediante sacarificación con la proteína H3A descrita anteriormente. Se añadió una cantidad de agua (120,0 Kg) al fermentador y se esterilizó calentando la camisa a 121°C, mantenidos durante 20 minutos. Se enfrió el agua a 47°C y se añadió la mezcla de mazorcas tratadas previamente a través de un puerto en la parte superior del tanque; se añadieron 20,0 Kg en ese momento. Se ajustó el pH a 5,3 con H₂SO₄ 1N y se añadió la preparación enzimática. La dosis de enzima fue 4,53 kg, que era equivalente a 14 mg de proteína por g de glucano+xilano en el total de mazorcas añadidas en ese momento. Durante las 12 horas siguientes, se realizaron cuatro adiciones de 15,0 kg de mazorcas al reactor, cada tres horas,
55

con el pH ajustado a 5,3 con H₂SO₄ 1N tras cada adición. La carga de sólidos objetivo para esta tirada fue del 25% en peso. Se controló el fermentador a 47°C y pH 5,3 durante aproximadamente 72 horas. Al final de este periodo de tiempo, se descargaron 20 litros para uso en estos experimentos, y los contenidos restantes del recipiente se fermentaron. Se analizó una muestra del hidrolizado y el resto se almacenó refrigerado hasta el uso. Los resultados del análisis de la muestra se muestran en la Tabla 1.

5

Tabla 1: Propiedades del hidrolizado del final de la sacarificación para FRF13

Monómero Glucosa (g/L)	49,20
Oligómero Glucosa (g/L)	20,45
Monómero Xilosa (g/L)	54,97
Oligómero Xilosa (g/L)	27,24
Monómero Arabinosa (g/L)	5,92
Oligómero Arabinosa (g/L)	4,58
Contenido de sólidos (% en peso)	24,1%

Hidrolizado de mazorcas MD07#3

Tratamiento previo

Se trataron lotes de mazorcas de maíz con un martillo de molino (Glen Mills Inc., Clifton, NH), se hicieron pasar por una criba de 0,95 cm (3/8 pulgadas) o 0,48 cm (3/16 pulgadas) y se trataron con un 6%, 8%, o 10% de amoníaco en relación al peso seco de biomasa en un reactor de 170 L Jaygo (Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ) mantenido a 145°C durante 20 minutos. Antes de la inyección del amoníaco acuoso se evacuó el reactor a ~ 10.000 Pa (0,1 bar), y tras el periodo de 20 minutos se evacuó rápidamente en dos etapas hasta ~ 10.000 Pa (0,1 bar). La concentración final de sólidos para la mezcla de mazorcas tratadas previamente fue de aproximadamente el 60%.

10

15 Sacarificación

Se generó el hidrolizado MD07#3 en un fermentador de 1.000 L, equipado con un bucle de recirculación. Se añadió una cantidad de agua (542,3 kg) al fermentador y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. Se enfrió el agua hasta 47°C y se añadió la mezcla de mazorcas tratadas previamente a través de un alimentador, situado en la parte superior del tanque; se añadieron 112,1 kg en ese momento. Se ajustó el pH a 5,3 con H₂SO₄ al 9,8% en peso y se añadió una primera dosis de enzimas. Ver la Tabla 2 para la masa de las enzimas utilizadas y las dosis correspondientes. Durante las nueve horas siguientes, se añadieron 317,6 kg de mazorcas de maíz tratadas previamente adicionales, con el pH controlado a 5,3 con H₂SO₄ al 9,8% en peso a lo largo de las adiciones. La carga de sólidos objetivo para esta tanda fue del 25% en peso. A las 12 horas tras la primera adición de enzimas, se añadió una segunda dosis (ver Tabla 2). Se controló el fermentador a 47°C y pH 5,3 durante aproximadamente 96 horas y se hizo circular el lodo a través del bucle de recirculación. Comenzando a las tres horas tras la primera adición de enzimas, se utilizó el molino de rotor-estator del bucle de recirculación intermitentemente para reducir el tamaño de partícula de las mazorcas tratadas previamente del lodo. Se utilizó el molino nueve veces entre 30 y 110 minutos cada vez. Al final de la tanda de 96 horas, se descargó un poco de material de hidrolizado para uso en estos experimentos. Se analizó una muestra del hidrolizado y el resto se almacenó refrigerado hasta su uso. Los resultados de los análisis de las muestras están contenidos en la Tabla 3.

20

25

30

Tabla 2: Enzimas utilizadas en la sacarificación de MD07#3

Nombre de la Enzima	Masa de la Primera Adición (kg)	Masa de la Segunda Adición (kg)	Dosis Total (mg Proteína / g glucano+xilano)
Spezyme® CP	3,72	14,77	16,6
Multifect® CX12L	20,11	0,00	6,6
Novozyme-188	0,75	2,92	4,2

Tabla 3: Propiedades del hidrolizado del final de la sacarificación para MD07#3

Monómero Glucosa (g/L)	72,50
Oligómero Glucosa (g/L)	20,62
Monómero Xilosa (g/L)	40,20

Oligómero Xilosa (g/L)	43,74
Monómero Arabinosa (g/L)	4,11
Oligómero Arabinosa (g/L)	7,94
Contenido de sólidos (% en peso)	22,4%

Se produjo MD07#3 clarificado a partir de hidrolizado MD07#3 mediante centrifugación y filtración, con una etapa final de filtración a través de un filtro de 0,2 µm.

Fuentes de virginiamicina

Se compró Lactrol[®] de Phibro (Ridgefield Park, NJ) y es 100% virginiamicina.

- 5 Se compraron Lactoside VTM y Lactoside 247TM de Lallemand Ethanol Technology (Milwaukee, WI).

Medios

MRS = 10 g/L de peptona, 8 g/L de extracto de carne, 4 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de glucosa, 5 g/L de acetato de sodio trihidratado, 1 g/L de Tween 80, 2 g/L de K₂HPO₄, 2 g/L de citrato de triamonio, 0,2 g/L de MgSO₄*7H₂O, 0,05 g/L de MnSO₄*4H₂O, pH 6,2.

- 10 Análisis HPLC

Se tomaron muestras de fermentación a intervalos cronometrados y se analizaron para EtOH, azúcares residuales, y otros productos metabólicos tales como ácido acético, ácido láctico, y glicerol utilizando o un sistema HPLC Waters (Alliance System, Waters Corp., Milford, MA) o un sistema Agilent 1100 Series LC; condiciones = 0,6 mL/min de H₂SO₄ 0,01N, volumen de inyección = 5 µL, temperatura del muestreador automático = 10°C, temperatura de la columna = 55°C, tiempo de operación = 25 min, detección mediante índice de refracción (mantenido a 40°C). La columna de HPLC se compró de BioRad (Aminex HPX-87H, BioRad Inc., Hercules, CA). Se cuantificaron los analitos mediante la detección del índice de refracción y se compararon con estándares conocidos.

15

Ejemplo 1

Tolerancia de *Z. mobilis* a la Virginiamicina

- 20 Se preparó un inóculo de la cepa ZW705 de *Z. mobilis* (descrita en Métodos Generales) reviviendo 2 mL de reserva congelada con OD~10 en medio MRM3G6 (10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de KH₂PO₄, 1 g/L de MgSO₄*7H₂O, 60 g/L de glucosa, pH 5,5) a 33°C durante ~ 8 h. Se utilizó este cultivo para inocular tubos que contenían hidrolizado MD07#3 clarificado (ver Métodos Generales) suplementado con 2 g/L de extracto de levadura y varias preparaciones de virginiamicina a una tasa de inoculación del 20% (volumen final), produciendo una OD inicial de ~0,5.
- 25 Se prepararon reservas de los agentes con virginiamicina Lactrol[®], Lactoside VTM o Lactoside 247TM a 1.000 ppm en etanol. Se añadieron estos agentes a los medios a 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, o 20 ppm. Las especificaciones de Lactrol[®] indican que la preparación es 100% actividad, indicando que 2,5 ppm de Lactrol[®] son equivalentes a 2,5 ppm de virginiamicina. La concentración de etanol inicial en cada tubo se elevó al 1,94% en volumen (200 µL en 10,3 mL) a través de la adición de las reservas con virginiamicina y etanol puro. Se mantuvieron los tubos a 33°C
- 30 con agitación durante 32 horas, monitorizando el crecimiento midiendo la OD₆₀₀. Tal y como se muestra en la Figura 2, ZW705 mostró mejor crecimiento en presencia de los agentes con virginiamicina que en el cultivo control que carece de virginiamicina, excepto en el medio con 10 ppm de Lactrol[®].

Ejemplo 2

Efecto de la Virginiamicina en el Control de la Contaminación en un Medio Iniciador de *Z. mobilis*

- 35 Se preparó un inóculo de la cepa ZW705 de *Z. mobilis* (descrita en Métodos Generales) reviviendo 2 mL de reserva congelada con OD~10 en medio MRM3G6 (10 g/L de extracto de levadura BBL, 2 g/L de KH₂PO₄, 1 g/L de MgSO₄*7H₂O, 60 g/L de glucosa, pH 5,5) a 33°C durante ~8 h, momento en el que la OD fue ~2. Se preparó un inóculo de la cepa ATCC 8014 de *Lactobacillus plantarum* inoculando medio MRS con una colonia individual y permitiendo el crecimiento a 33°C durante 8 h, momento en el que la OD fue ~0,4.
- 40 Se preparó medio iniciador (10 g/L de extracto de levadura Amberex695, 2 g/L de KH₂PO₄, 5 g/L de MgSO₄*7H₂O, 10mM de sorbitol, 150 g/L de glucosa, pH 5,5) y se esterilizó mediante autoclavado (121°C, 30 min). Se inoculó una muestra de 500 mL de medio con una mezcla de *Z. mobilis* ZW705 (hasta una OD de 0,05) y *L. plantarum* ATCC 8014 (hasta una OD de 0,0005) produciendo un nivel de contaminación de 1:100, y se fermentó a 33°C y pH 5,5 (se añadió NH₄OH 4N cuando fue necesario para el control del pH). En una segunda muestra, se añadió 2 ppm de Lactrol[®]. Esto es equivalente a 2 ppm de virginiamicina ya que el Lactrol[®] es 100% ingrediente activo. Se analizaron las cantidades de ácido láctico y etanol producidas en el medio a diferentes tiempos mediante HPLC (columna Aminex 87H, H₂SO₄ 0,01N, 0,6 mL/min) y los resultados se muestran en la Figura 3A (ácido láctico) y 3B (etanol).
- 45

En ausencia de cualquier antimicrobiano (muestra F1067), tras 19,3 h de fermentación, se habían formado 2,4 g/L de ácido láctico y 60,3 g/L de etanol. En el cultivo paralelo con 2 ppm de Lactrol[®] añadidos al medio (muestra F1068), se produjeron 0,3 g/L de ácido láctico a las 19,3 h, ilustrando la efectividad de una dosis de 2 ppm de Lactrol[®] en la reducción del crecimiento de *L. plantarum*, demostrada por una concentración de ácido láctico reducida. La cantidad de etanol producida en la presencia de Lactrol[®] permaneció equivalente a la cantidad producida en el cultivo control.

También se midió la glucosa mediante HPLC, tal y como se describió anteriormente, y los resultados mostraron que el consumo de glucosa fue similar para los cultivos con y sin Lactrol[®] (Figura 4).

Ejemplo 3

10 Efecto de utilizar Iniciador de *Z. mobilis* tratado con Virginiamicina como Inóculo de Medio de Hidrolizado

Se utilizó una muestra del cultivo F1067 (no Lactrol[®]) a EFT=19,3 h del Ejemplo 1 como cultivo iniciador para inocular 450 mL de medio de hidrolizado de mazorcas (FRF13; ver Métodos Generales) (ajustado a pH 5,8, + 10 mM de sorbitol) al 10% en volumen (volumen final), que se fermentó a 33°C (reducidos a 30°C a EFT=21 h) y pH 5,8 (ajustado con NaOH 4N). Tras 48 h de fermentación (muestra F1069), se habían formado 27,6 g/L de ácido láctico (Figura 5A) y 32,6 g/L de etanol (Figura 5B). En un experimento paralelo se utilizó una muestra del cultivo F1068 (con 2 ppm de Lactrol[®]) a 19,3 h (del Ejemplo 1) como el cultivo iniciador para inocular el mismo medio al mismo 10% en volumen. Tras 48 h de fermentación (muestra F1070), se habían formado 73,5 g/L de etanol (Figura 5B), con una cantidad de ácido acético producido no detectable (Figura 5A). Los resultados muestran que una pequeña dosis de Lactrol[®] utilizada en el iniciador contaminado fue suficiente para prevenir la contaminación de la fermentación de hidrolizado.

Se analizaron también la xilosa y la glucosa durante ambas fermentaciones de hidrolizado mediante HPLC tal y como se describió anteriormente, y los resultados se muestran en la Figura 6. Ambas fermentaciones mostraron un consumo de glucosa completo, sin embargo la fermentación inoculada con el iniciador que contiene Lactrol[®] consumió glucosa más rápidamente. La fermentación inoculada con el iniciador que contiene Lactrol[®] también tuvo un consumo de xilosa casi completo, mientras que en la fermentación inoculada con el iniciador que carecía de Lactrol[®] no se consumió más del 50% de la xilosa (Figura 6).

Ejemplo 4

Efecto de la Virginiamicina en la Fermentación de Hidrolizado de *Z. mobilis* Contaminada

Para determinar la dosis de Lactrol[®] requerida para prevenir la formación de ácido láctico durante la fermentación de hidrolizado, se utilizó una porción de cultivo iniciador F1067 a EFT=19,3 h (del Ejemplo 1) contaminado intencionadamente como cultivo iniciador para inocular medio de hidrolizado de mazorcas (FRF13; ver Métodos Generales) (ajustado a pH 5,8, + 10 mM de sorbitol) al 10% en volumen (volumen final) que contenía 0 ppm (muestra F1069) o 2 ppm (muestra F1071) de Lactrol[®], que entonces se fermentó a 33°C (reducidos a 30°C a EFT=21 h) y pH 5,8 (ajustado con NaOH 4N).

Para explorar mayores concentraciones de Lactrol[®], se produjo un cultivo iniciador similar a F1067 y se utilizó como inóculo para la fermentación del hidrolizado de mazorcas de una forma similar a la descrita anteriormente, en presencia de 10, 50, o 250 ppm de Lactrol[®] (muestras F1081-1083, respectivamente). Los resultados en la Figura 7A muestran que tras 45 horas se produjeron grandes cantidades (> 20 g/L) de ácido láctico en medio que contenía 0 y 2 ppm de Lactrol[®]. Incluir 10 ppm de Lactrol[®] redujo la formación de ácido láctico a ~5 g/L a 45 horas. Incluir 50 ppm y 250 ppm de Lactrol[®] mantuvo la concentración de ácido láctico a < 1 g/L, ilustrando que se necesitan mayores concentraciones de virginiamicina para el control de microorganismos contaminantes durante la fermentación de hidrolizado.

La producción de etanol fue mayor en fermentaciones que contenían 10 ppm, 50 ppm, o 250 ppm de Lactrol[®] que en fermentaciones que contenían 0 ppm o 2 ppm, tal y como se muestra en la Figura 7B.

45

REIVINDICACIONES

1. Un caldo de fermentación cuya composición comprende:
 - a) un medio de fermentación;
 - b) virginiamicina; y
 - 5 c) una población de células de *Zymomonas* en crecimiento.
2. El caldo de fermentación de la reivindicación 1, en donde la concentración de ácido láctico es menor que aproximadamente 5 g/L.
3. El caldo de fermentación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el medio de fermentación carece de hidrolizado de biomasa celulósica.
- 10 4. El caldo de fermentación de la reivindicación 3, en donde la concentración de virginiamicina es al menos aproximadamente 0,25 ppm.
5. El caldo de fermentación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el medio de fermentación comprende hidrolizado de biomasa celulósica.
- 15 6. El caldo de fermentación de la reivindicación 5, en donde la concentración de virginiamicina es al menos aproximadamente 10 ppm.
7. El caldo de fermentación de la reivindicación 6, en donde la concentración de virginiamicina es al menos aproximadamente 20 ppm.
8. Un método para controlar la contaminación bacteriana en una fermentación que utiliza un biocatalizador de células de *Zymomonas*, que comprende:
 - 20 a) proporcionar un medio de fermentación;
 - b) añadir virginiamicina al medio de fermentación;
 - c) añadir al medio de fermentación un inóculo de células de *Zymomonas*, produciendo por tanto un caldo de fermentación; y
 - 25 d) mantener el caldo de fermentación bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de las células de *Zymomonas*;en donde las etapas b) y c) se pueden realizar en cualquier orden o concurrentemente y en donde se controla la contaminación bacteriana.
9. El método de la reivindicación 8, en donde las células de *Zymomonas* producen etanol en el caldo de fermentación.
- 30 10. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde el medio de fermentación carece de hidrolizado de biomasa celulósica.
11. El método de la reivindicación 10, en donde se añade virginiamicina en una concentración que es al menos aproximadamente 0,25 ppm.
- 35 12. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde el medio de fermentación comprende hidrolizado de biomasa celulósica.
13. El método de la reivindicación 12, en donde se añade virginiamicina en una concentración que es al menos aproximadamente 10 ppm.
14. Un método para producir etanol que comprende:
 - a) proporcionar un medio de fermentación;
 - 40 b) añadir al medio de fermentación un inóculo de células de *Zymomonas* que han crecido en la presencia de virginiamicina, produciendo un caldo de fermentación; y
 - c) mantener el caldo de fermentación bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de las células de *Zymomonas* y la producción de etanol por las células de *Zymomonas*;

en donde no se añade virginiamicina al medio de fermentación por separado del inóculo de (b) y en donde se produce etanol y en donde el medio de fermentación comprende hidrolizado de biomasa celulósica o carece de hidrolizado de biomasa celulósica.

5 15. El método de la reivindicación 14, en donde el inóculo de células de *Zymomonas* de (b) se hace crecer en medio que carece de hidrolizado de biomasa celulósica y la concentración de virginiamicina es de al menos aproximadamente 0,25 ppm o entre aproximadamente 1 ppm y aproximadamente 10 ppm.

16. Un método para mejorar el crecimiento de células de *Zymomonas*, que comprende hacer crecer células de *Zymomonas* en medio de fermentación que comprende virginiamicina.

10 17. El método de la reivindicación 14 o la reivindicación 16, en donde la concentración de virginiamicina es de al menos aproximadamente 10 ppm.

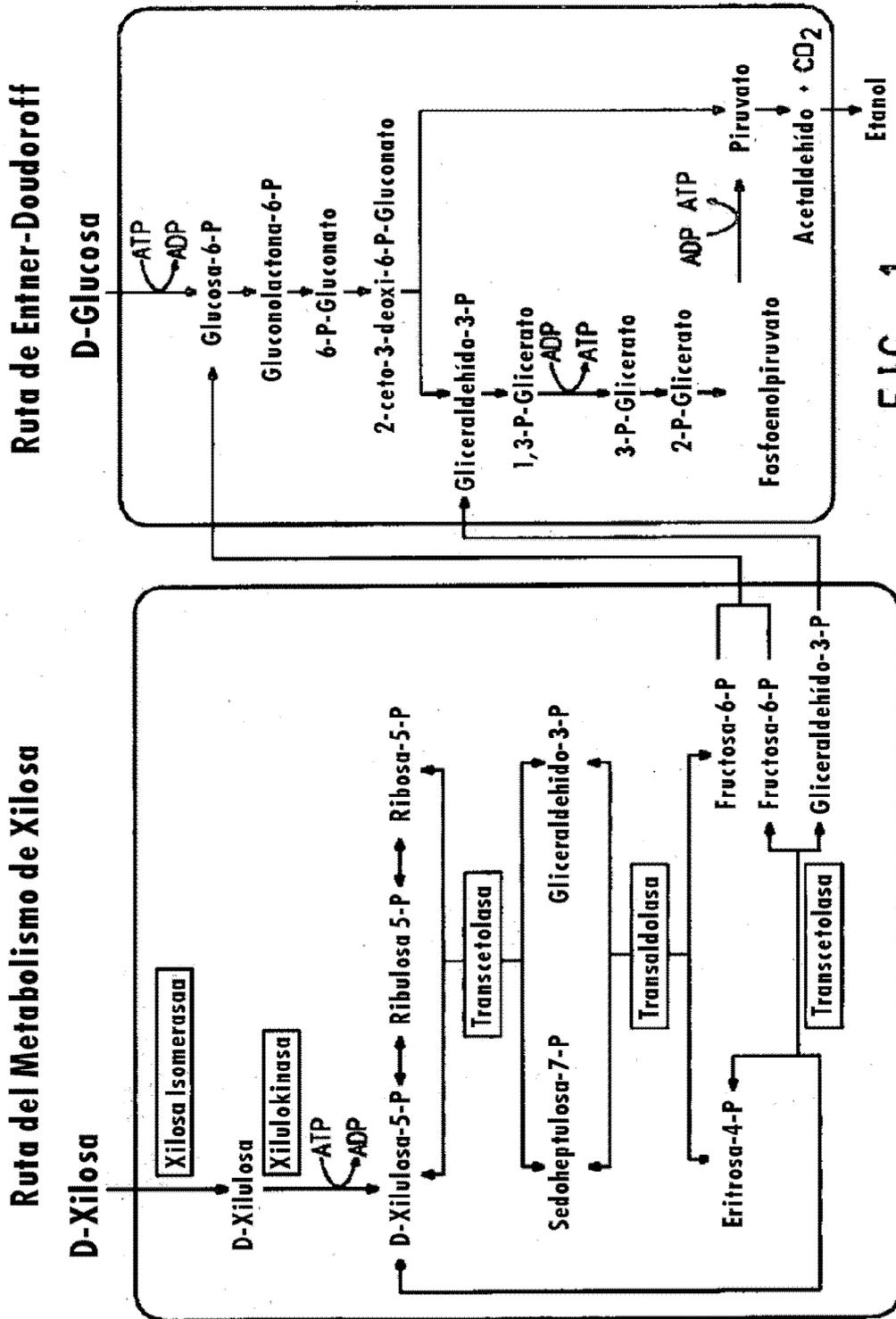


FIG. 1

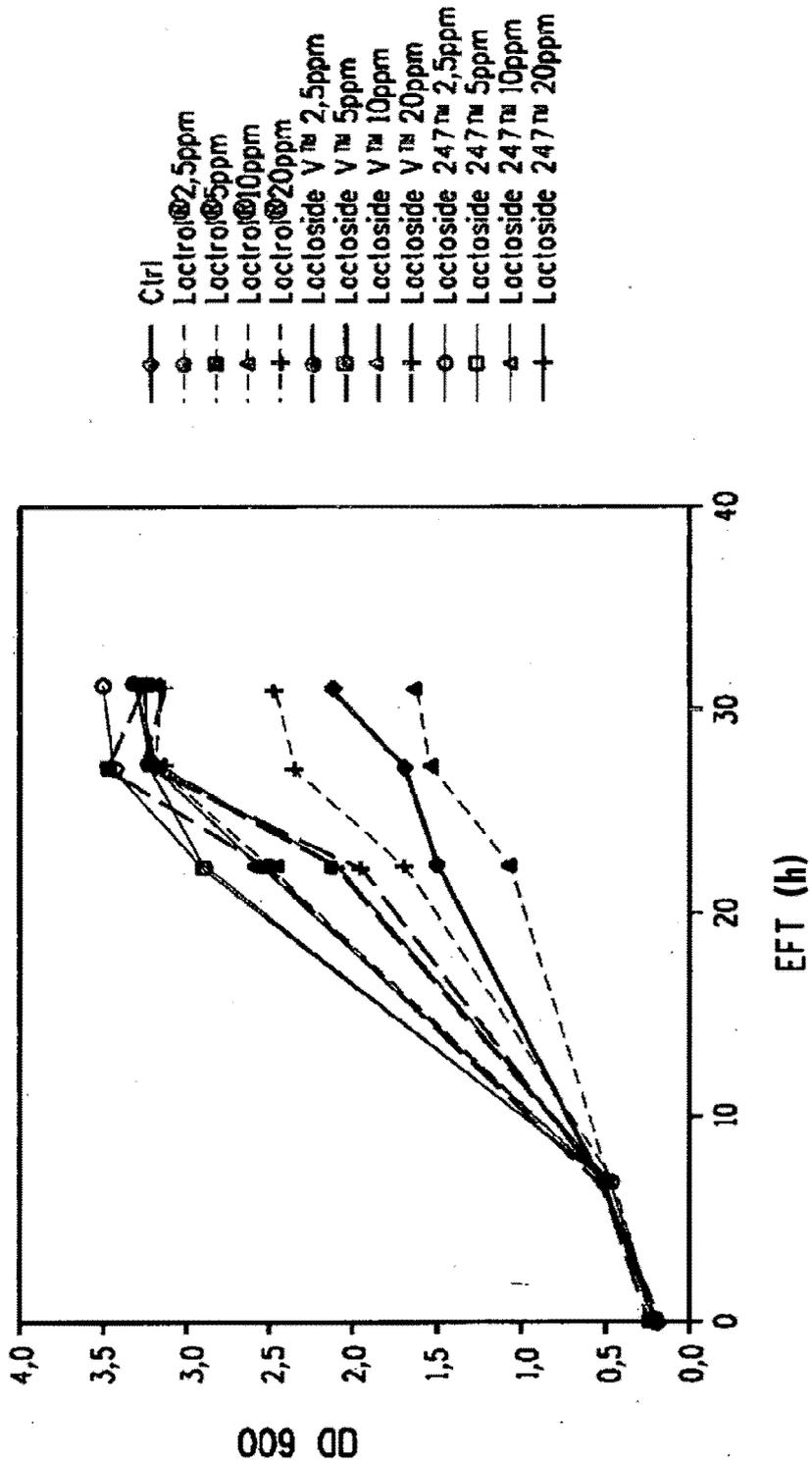


FIG. 2

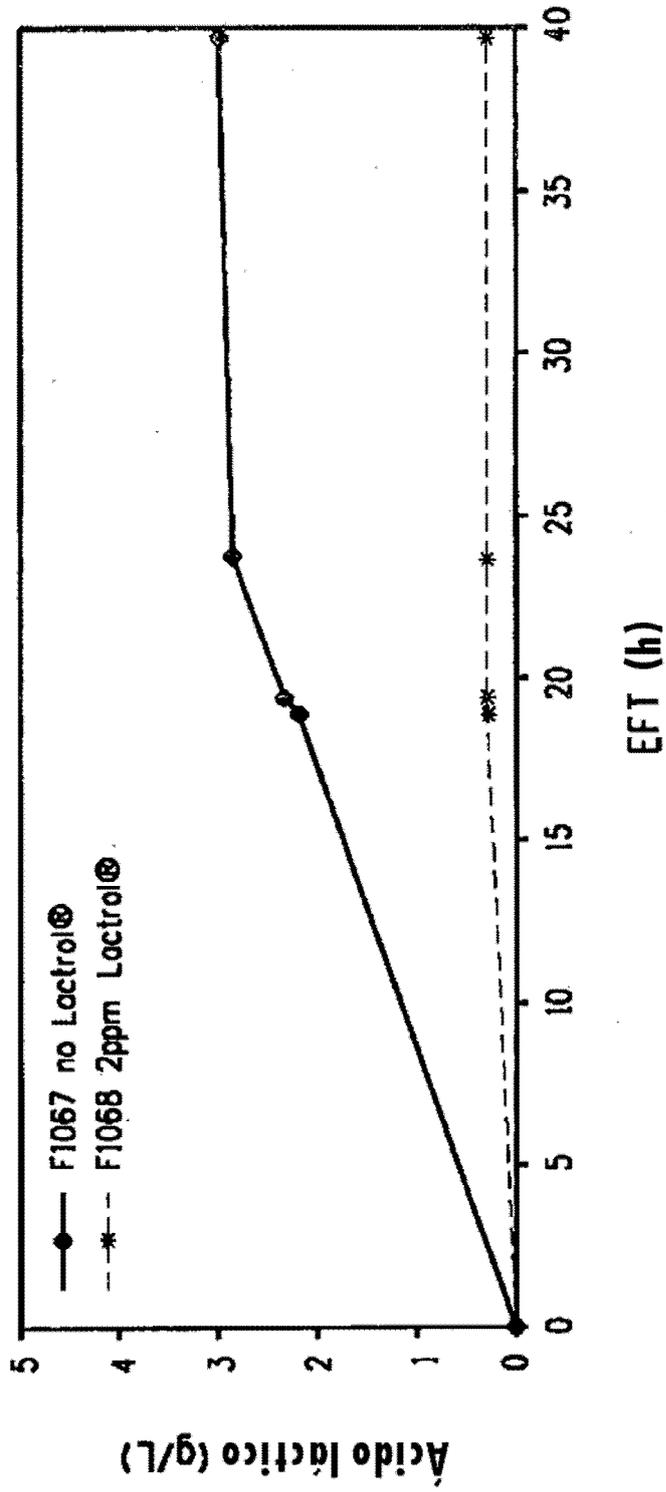


FIG. 3A

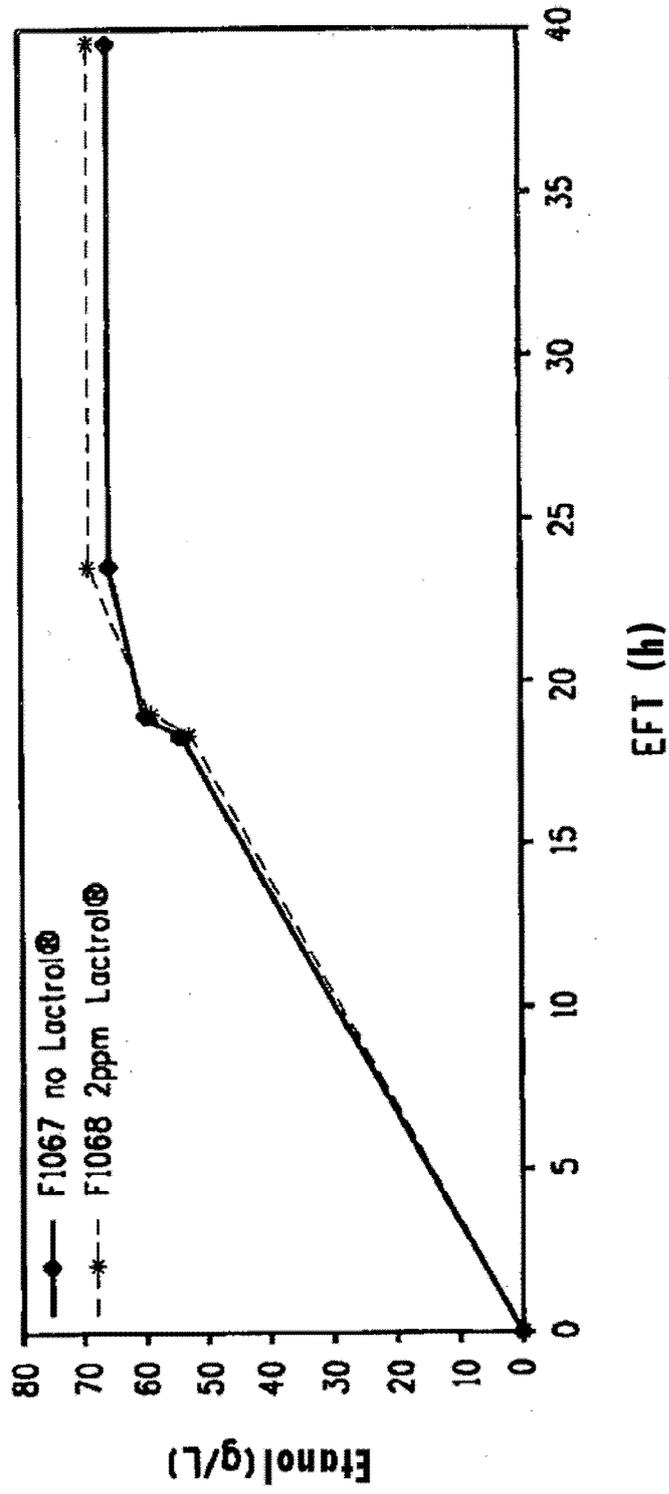


FIG. 3B

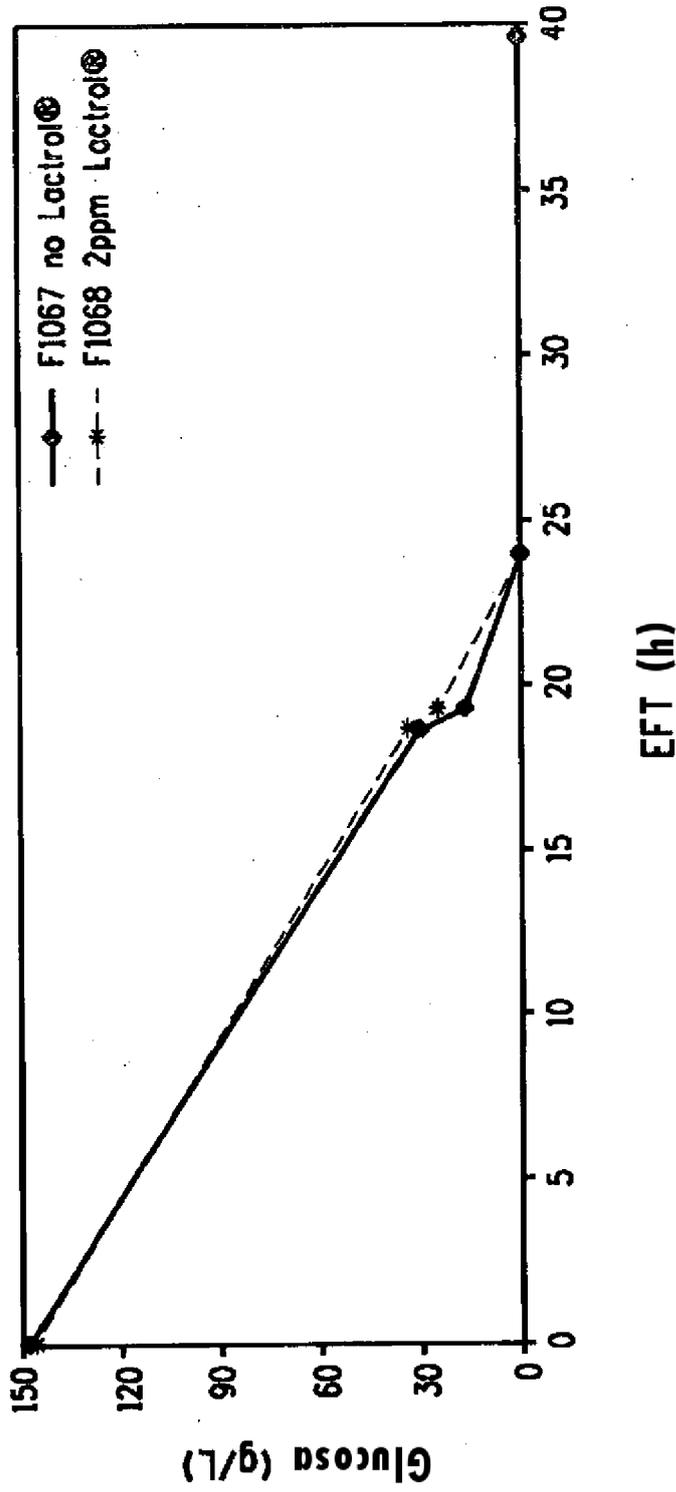


FIG. 4

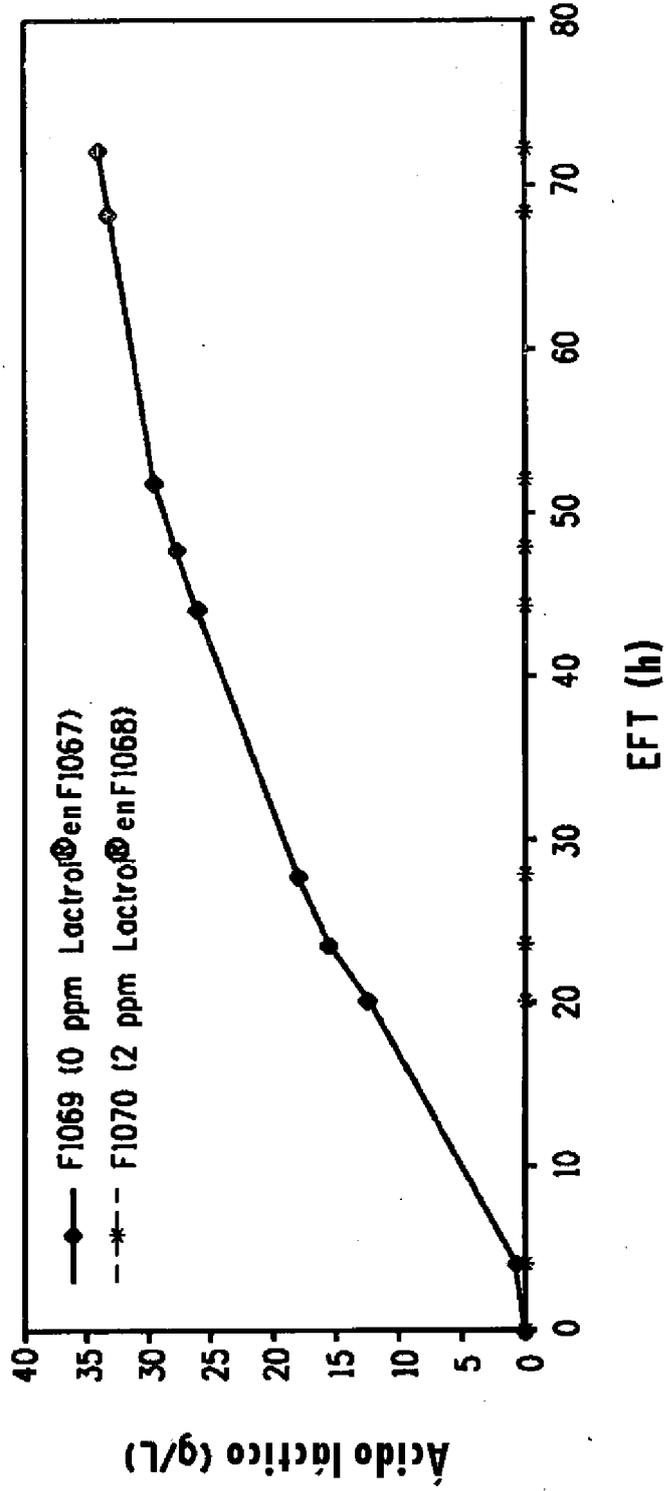


FIG. 5A

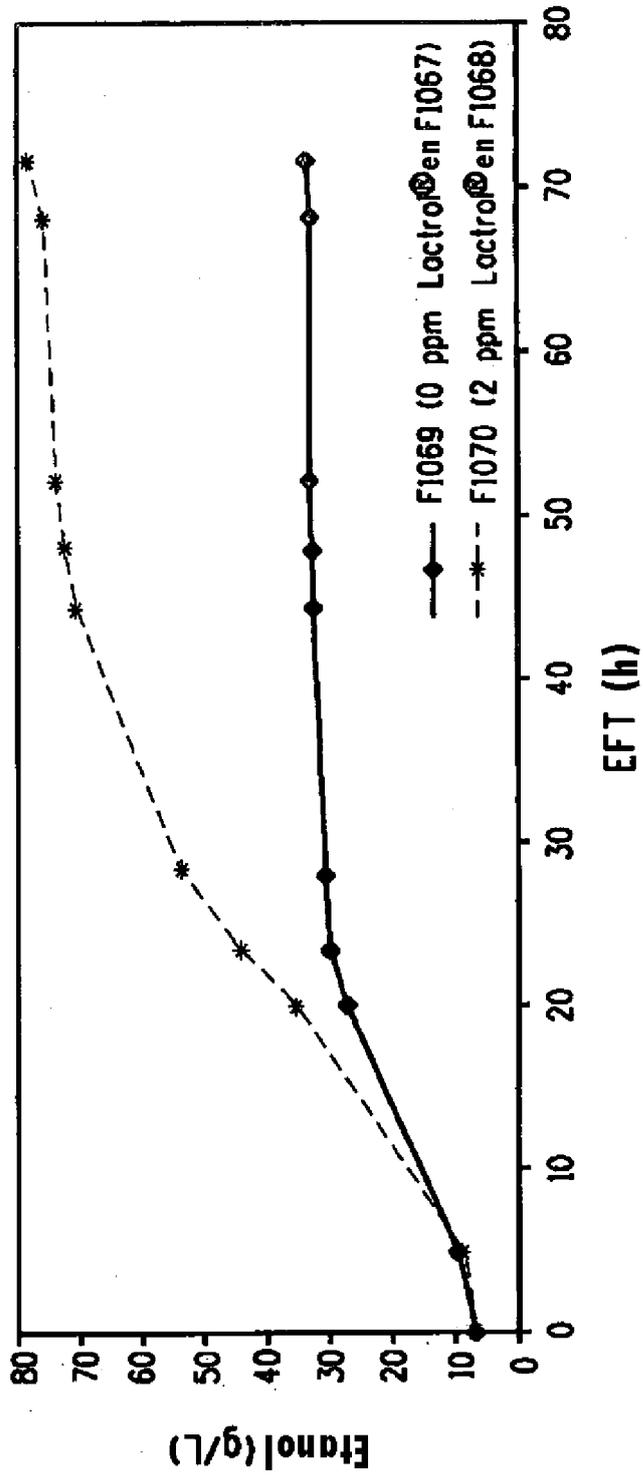


FIG. 5B

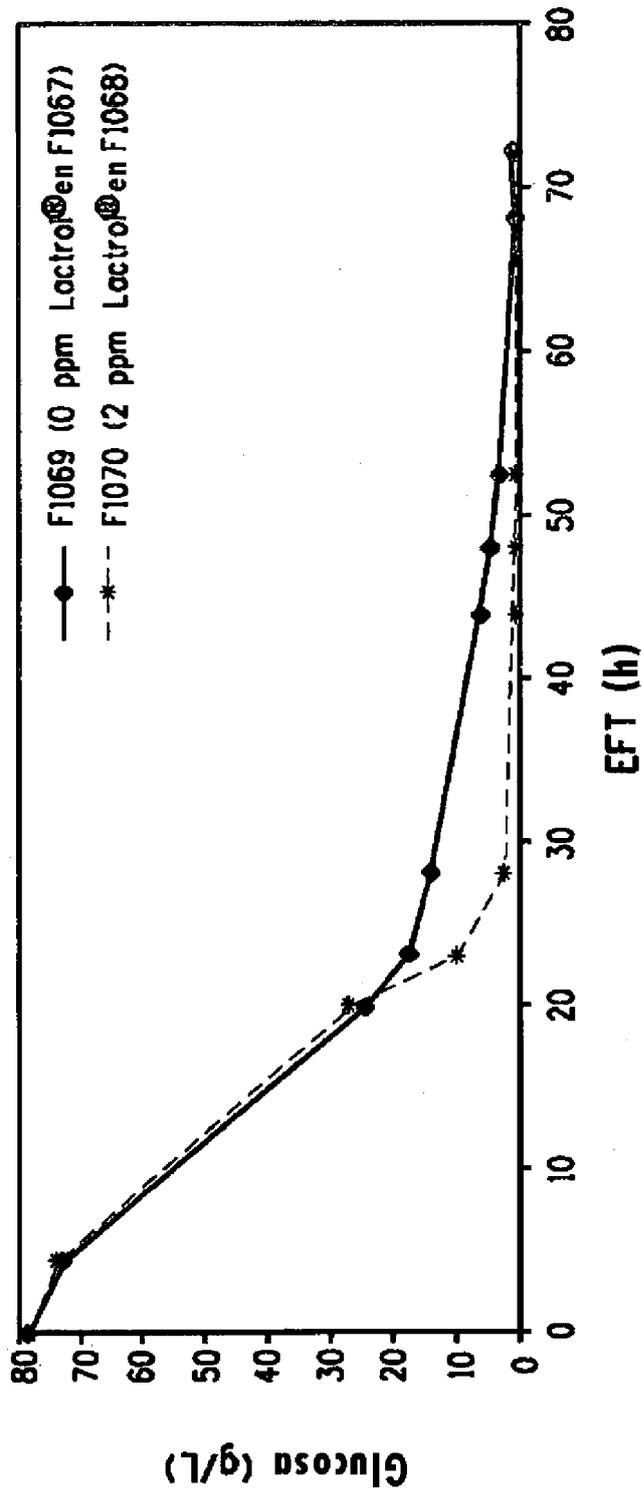


FIG. 6A

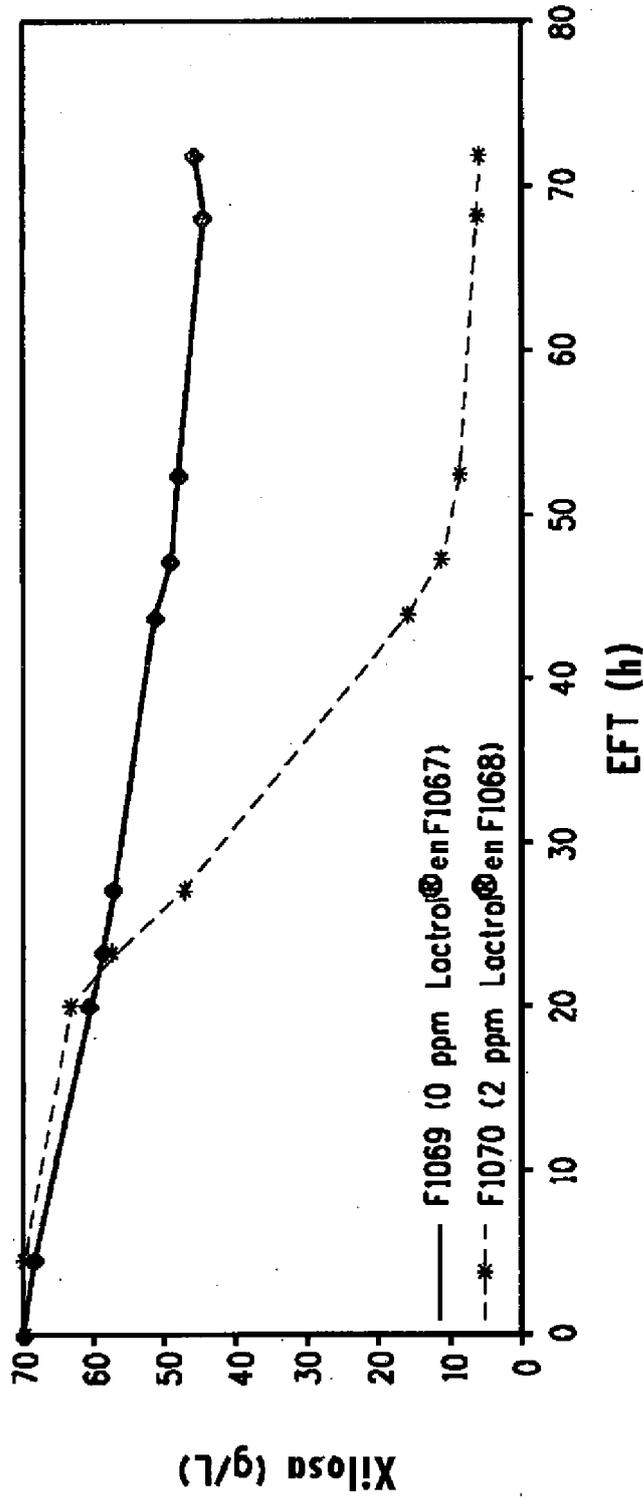


FIG. 6B

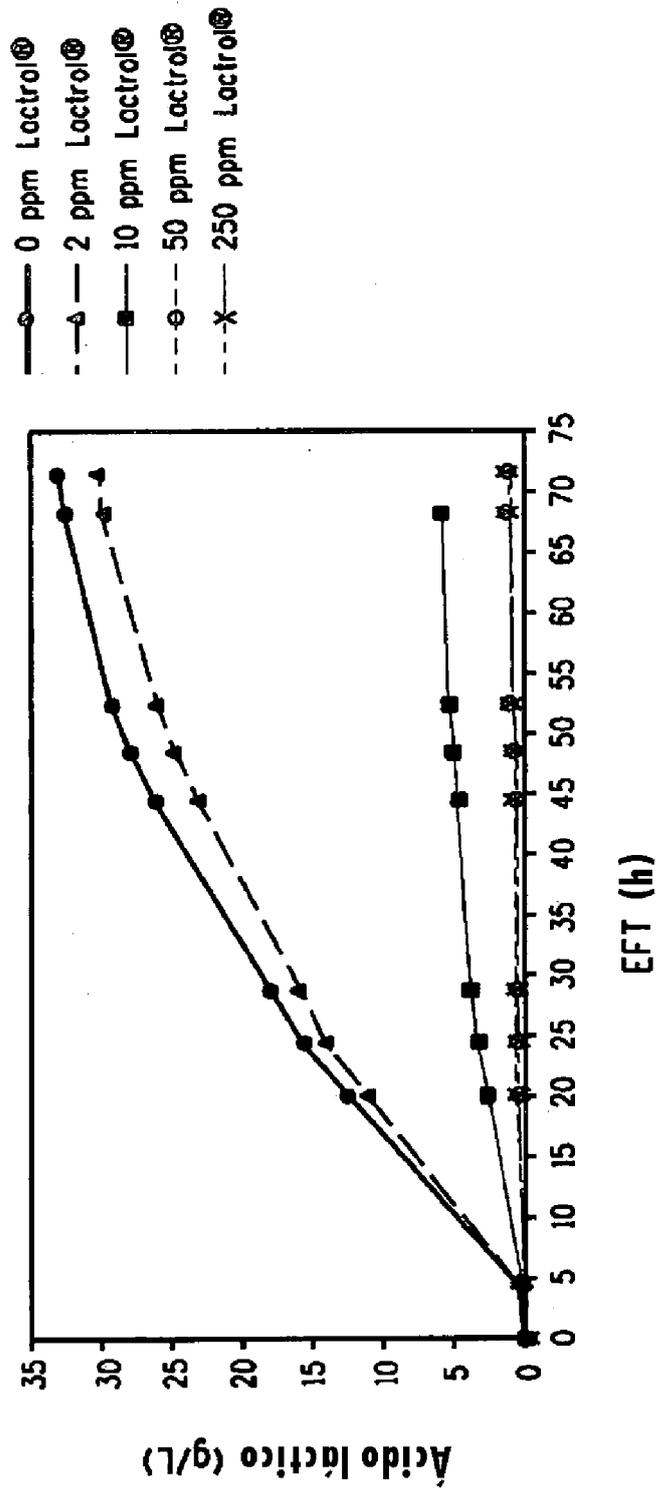


FIG. 7A

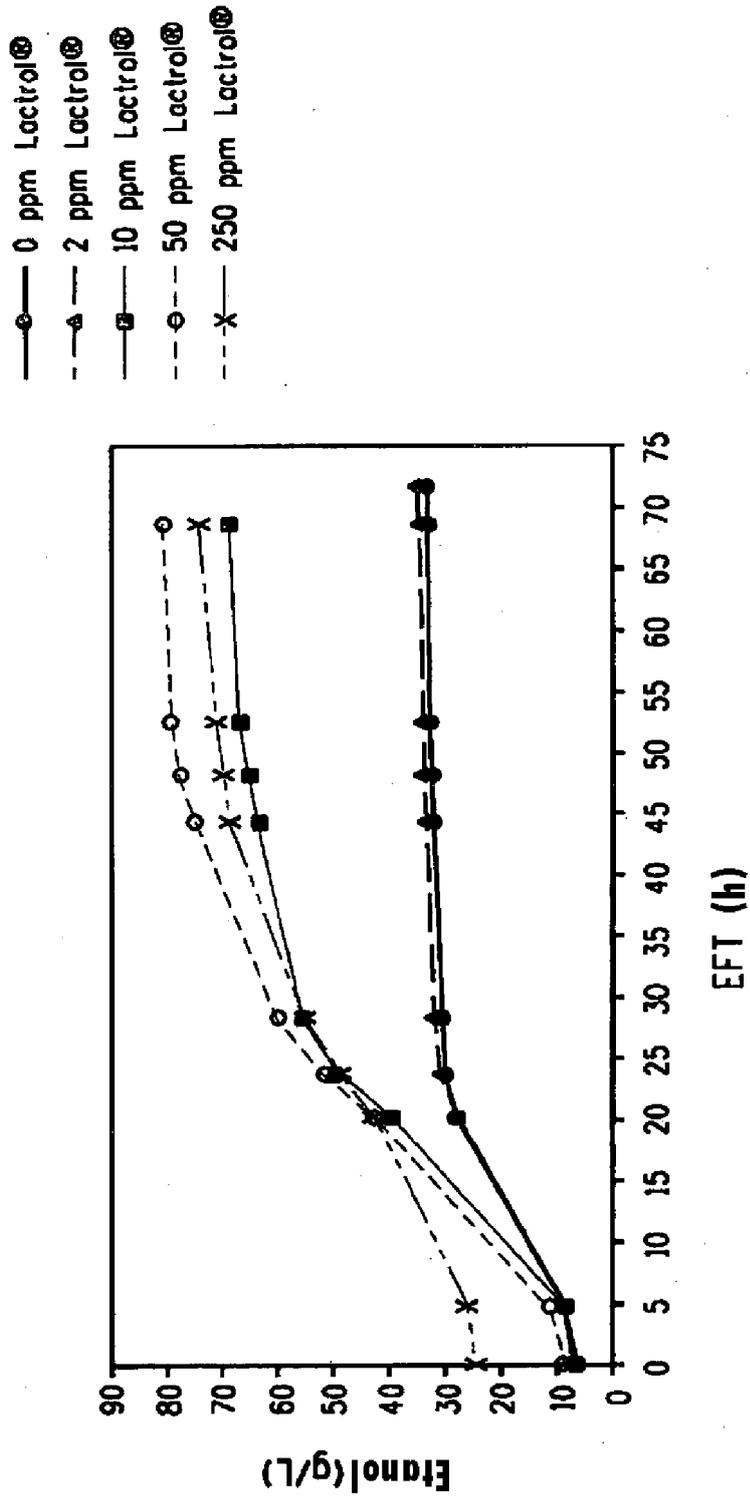


FIG. 7B