(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 755 680**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/04	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01)
C12N 9/16	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)
C12N 15/81	(2006.01)
C12P 7/06	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2016** **PCT/EP2016/061099**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016** **WO16188813**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2016** **E 16725073 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019** **EP 3298133**

(54) Título: **Célula de levadura que consume acetato**

(30) Prioridad:

22.05.2015 EP 15168833

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2020

(73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es:

KLAASSEN, PAUL;
SCHMITZ, JOZEF, PETRUS, JOHANNES;
DE WAAL, PAULUS, PETRUS y
BOUMA, ARJEN

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 755 680 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

Célula de levadura que consume acetato

Campo de la invención

La presente invención se refiere a microorganismos manipulados tales como levaduras. En particular, la invención se refiere a células de levadura conversoras de ácido acético, pentosa y glucosa con conversión de pentosa mejorada. La invención se refiere además a los procesos en los que las células de levadura producen un producto de fermentación tal como etanol.

Antecedentes de la invención

El bioetanol de segunda generación se produce a partir de, por ejemplo, fracciones lignocelulósicas de biomasa vegetal que se hidroliza en glúcidos monoméricos libres, tales como hexosas y pentosas, para su fermentación en etanol. Aparte de la liberación de glúcido durante el pretratamiento y la hidrólisis de la biomasa, se forman algunos subproductos tóxicos. Por ejemplo, el furfural y HMF son dos de estos productos. Las cantidades en que se forman dependen de varios parámetros de pretratamiento, tales como la temperatura, presión y tiempo de pretratamiento. Los hidrolizados lignocelulósicos también contienen altas cantidad de ácido acético, que es un potente inhibidor de la capacidad fermentativa de los microorganismos, tales como levaduras.

El glicerol es el subproducto principal durante la fermentación de glúcidos en etanol, principalmente formado como resultado de reacciones de reoxidación para consumir el exceso de NADH formado durante la producción de etanol en condiciones aeróbicas. Como resultado, durante las fermentaciones industriales, de aproximadamente un 5 a un 10 % de los glúcidos consumidos por las células de levadura se desvían al glicerol. Reducir la cantidad de este poliol se considera una vía prometedora para aumentar el rendimiento de etanol. Esto podría conseguirse ajustando la tasa de alimentación durante el proceso semidiscontinuo, o seleccionando cepas que produzcan menos glicerol, sin embargo, ambas estrategias tienen un efecto relativamente limitado.

Se ha informado de varias estrategias diferentes que podrían ayudar a reducir el efecto inhibidor del ácido acético sobre la capacidad de fermentación de los glúcidos en hidrolizados, así como resolver (parcialmente) los problemas del equilibrio de oxidorreducción tras la eliminación de los genes implicados en la producción de glicerol, por ejemplo, por genomanipulación de las levaduras.

Sonderegger *et al.* (2004) divulga la expresión heteróloga de fosfotransacetilasa y acetaldehído deshidrogenasa en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* fermentadora de xilosa. En combinación con la fosfocetolasa nativa, Sonderegger *et al.* crearon de este modo una ruta de fosfocetolasa funcional que tiene capacidad de reoxidación neta del NADH generado por la expresión heteróloga de una xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa que se usan para la utilización de xilosa en esa cepa particular.

Guadalupe *et al.* (2009) describieron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la que se elimina la producción del subproducto glicerol mediante la alteración de los genes endógenos de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD (*GPD1* y *GPD*2). La expresión del gen *mhpF* de *E. coli*, que codifica la acetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD acetilante, restauró la capacidad de la cepa de doble eliminación de *gpd1gpd2* de crecer en condiciones anaeróbicas por complementación del medio con ácido acético.

Yu *et al.* (2010) construyeron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* manipuladas metabólicamente para una producción mejorada de etanol a partir de glicerol por sobreexpresión simultánea de glicerol deshidrogenasa (codificada por *GCY*1), dihidroxiacetona cinasa (*DAK1*) y la proteína de captación de glicerol (*GUP1*). En un informe posterior del mismo grupo (Yu *et al.,* 2011) se describe que la sobreexpresión adicional de *ADH1* y *PDC1,* que codifican la alcohol deshidrogenasa y la piruvato descarboxilasa, respectivamente, causaba un aumento en la tasa de crecimiento y el consumo de glicerol en condiciones fermentativas, lo que provoca un rendimiento de etano final ligeramente aumentado.

Lee y Dasilva (2006) divulgaron la levadura *Saccharomyces cerevisiae* manipulada para producir 1,2-propanodiol a partir de glicerol introduciendo, entre otras cosas, la expresión de los genes *mgs* y *gldA* de *Escherichia coli.*

La tecnología descrita por Guadalupe *et al.* (y también en la solicitud de patente WO 2011/010923) proporciona una solución para disminuir el contenido de ácido acético de hidrolizados durante la fermentación de glúcidos de biomasa y el ácido acético mencionado anteriormente en, por ejemplo, el etanol.

Es potencialmente posible una potenciación adicional de la capacidad de convertir ácido acético introduciendo una ruta adicional de generación de NADH, por ejemplo, (sobre)expresando adicionalmente una ruta de consumo de glicerol. Tras la introducción de los genes *GUP1, GCY1* y *DAK1* mencionados anteriormente (Yu *et al.,* 2010) en una cepa de levadura que exprese una ruta de conversión de ácido acético anaeróbica (tal como se describe, por ejemplo, por Medina *et al.,* 2009), la conversión de ácido acético debe aumentarse para mantener el equilibrio de

oxidorreducción, que da lugar a destoxificación aumentada adicional del hidrolizado y mayor rendimiento de etanol. La solución de Yu *et al*., sin embargo, no funciona, ya que la glicerol deshidrogenasa de levadura (codificada por *GCY1*) usa $NADP^+$ como cofactor, provocando un desequilibrio del cofactor debido a insuficiente regeneración del cofactor. Se ensayó una glicerol deshidrogenasa alternativa (*gldA* de *E. coli*) en combinación con la ruta de reducción de ácido acético y, de hecho, potenció la conversión de ácido acético en condiciones de crecimiento anaeróbicas (fermentación) (solicitud de patente WO 2013/081456). No obstante, aún hay una necesidad de mejorar la conversión de acetato, pentosa y/o hexosa en producto de fermentación.

Sumario de la invención

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar levaduras que puedan producir etanol a partir de ácido acético o acetato mientras retienen sus capacidades de fermentar hexosas (glucosa, fructosa, galactosa, etc.), así como pentosas como xilosa, así como procesos en los que estas cepas se usan para la producción de etanol y/u otros productos de fermentación.

Otro objeto es proporcionar células, por ejemplo, células de mamífero que puedan producir etanol a partir de glicerol y/o glicerol y ácido acético mientras retienen sus capacidades de fermentación de hexosas (glucosa, fructosa, galactosa, etc.), así como pentosas como xilosa. Otro objeto es aumentar la producción del producto de fermentación (rendimiento, tasa de producción o ambos). En una realización de la misma, la levadura produce menos glicerol.

Además, un objeto de la invención es proporcionar una cepa de levadura que pueda cofermentar de forma aeróbica acetato, pentosa y glucosa.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método rentable de producción de etanol por fermentación de pentosa y/o acetato.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una célula de levadura que puede fermentar pentosa a una tasa mayor de lo que puede conseguir usando cepas actualmente conocidas en la técnica.

Otro objeto es reducir el tiempo de fermentación de la fermentación C5/C6.

Otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la revisión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

Uno o más de estos objetos se obtienen de acuerdo con la invención que proporciona una célula de levadura que está modificada genéticamente, que comprende:

a) una alteración de una o más aldehído deshidrogenasas nativas de la levadura;
b) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una acetaldehído deshidrogenasa de acetilación dependiente de NAD+ (E.C. 1.2.1.10) heteróloga;
c) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una acetil-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.1) homóloga u heteróloga; y
d) una modificación que da lugar a reducción de la actividad de glicerol 3-fosfato fosfohidrolasa y/o glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, en comparación con la levadura sin dicha modificación.

En una realización, la una o más aldehído deshidrogenasas (E.C:1.2.1.4) nativas de la levadura en d) es una acetaldehído deshidrogenasa-6 (*ALD6*) nativa de la levadura.

La invención se refiere además a un proceso para la preparación de una célula de levadura fermentadora de pentosa, en el que una célula de levadura que comprende uno o más genes exógenos de una ruta de pentosa se somete a alteración del gen *ALD6* nativo de la célula de levadura.

La invención se refiere además a un proceso de fermentación en el que glúcido lignocelulósico se convierte por la célula de levadura alteradora en producto de fermentación. En una realización de la misma, el producto de fermentación es etanol.

La invención se refiere además a un proceso de propagación aeróbica de una levadura que consume acetato.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un esquema de modelo matemático (estrategia de modelo mínimo). Los números indican los siguientes procesos: 1.) captación y metabolismo de glucosa (glucólisis superior), 2.) captación y metabolismo de xilosa, 3.) captación y metabolismo de glicerol, 4.) formación de etanol (glucólisis inferior), 5.) captación y metabolismo de acetato, 6.) formación de biomasa, 7.) recambio de ATP para el mantenimiento, 8.) producción de CO2 y etanol.

La figura 2 muestra un resumen esquemático de la estrategia: eliminación de ALD6 usando el marcador zeoMX. Estas modificaciones se introdujeron en YD01247, YD01248.

La figura 3 muestra las predicciones del modelo de disminución del ATP de mantenimiento sobre glucosa y xilosa para las tasas de conversión de etanol.

La figura 4 muestra un resumen esquemático de las rutas metabólicas implicadas en el ciclo fútil de aldehído-acetato-acetil-CoA, que causa un ATP de mantenimiento aumentado. El ciclo fútil se indica por flechas discontinuas. La acetaldehído deshidrogenasa acetilante (adhE, acdH) se introdujo en la cepa para posibilitar la conversión de acetato en etanol.

La figura 5 muestra una comparación de las tasas de consumo de glúcido y formación de etanol entre la referencia (YD01248, YD01247; líneas transparentes) y las cepas de eliminación de ALD6 (YD01248Δald6, YD01247Δald6; líneas rellenas).

Breve descripción de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 pRN772 (plásmido que alberga la secuencia loxP-kanMX-loxP)
SEQ ID NO: 2 cebador 12388 (flanco 5' de ald6 directo)
SEQ ID NO: 3 cebador 12389 (flanco 3' de ald6 inverso)

Descripción detallada de la invención

En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprender" e "incluir" y variaciones tales como "comprende", "comprendiendo", "incluye" e "incluyendo" deben interpretarse de forma inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden transmitir la posible inclusión de otros elementos o números enteros no indicados específicamente, donde el contexto lo permita.

Los artículos "un/o" y "una" se usan en este documento para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento. A modo de ejemplo, la célula en este documento puede ser una célula, pero se refiere también a una población de células o una cepa.

"Levadura" en este documento se define como microorganismo eucariota e incluye todas las especies de la subdivisión *Eumycotina* que crece predominantemente en forma unicelular. Las levaduras pueden crecer por gemación de un talo unicelular o pueden crecer por fisión del organismo. Las células de levaduras preferidas para su uso en la presente invención pertenecen a los géneros *Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Pichia, Schizosaccharomyces, Hansenula, Kloeckera, Schwanniomyces,* y *Yarrowia.* En una realización de la misma, la célula de levadura pertenece a una especie seleccionada del grupo que consiste en *S. cerevisiae, S. exiguus, S. bayanus, K. lactis, K. marxianus* y *Schizosaccharomyces pombe.* En una realización, la célula de levadura es de la especie *Saccharomyces cerevisiae.* Preferiblemente, la levadura tiene capacidad de fermentación anaeróbica, más preferiblemente fermentación alcohólica anaeróbica.

En este documento se entiende que "alteración" significa cualquier alteración de la actividad e incluye, aunque sin limitación, eliminación, mutación, reducción de la afinidad del gen alterado y expresión del ARN de antisentido complementario al ARNm de *ALD6*. Un alterador génico es una célula que tiene una o más alteraciones del gen respectivo. Nativo de la levadura, en este documento, se entiende como el gen que está presente en la célula de levadura antes de la alteración. Incluye la situación de que el gen nativo de la levadura esté presente en una célula de levadura de tipo silvestre, una célula de levadura de laboratorio o una célula de levadura industrial. Una célula de levadura también puede indicarse en este documento como cepa de levadura o como parte de cepa de levadura.

Las diversas realizaciones de la invención descrita en este documento pueden combinarse de forma cruzada.

La invención proporciona una célula de levadura que está modifica genéticamente, que comprende:

a) una alteración de una o más aldehído deshidrogenasas (E.C:1.2.1.4) nativas de la levadura;
b) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD+ (E.C. 1.2.1.10) heteróloga;
c) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una acetil-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.1) homóloga o heteróloga; y
d) una modificación que da lugar a la reducción de la actividad de glicerol 3-fosfato fosfohidrolasa y/o glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, en comparación con la levadura alteradora sin dicha modificación.

En una realización de la invención, la una o más aldehído deshidrogenasas (E.C:1.2.1.4) nativas de la levadura en c) es una acetaldehído deshidrogenasa-6 (*ALD6*).

Una célula con una o más alteración(es) de la aldehído deshidrogenasa se denomina en este documento célula de levadura alteradora. La célula con alteración del gen *ALD6* en este documento se llama célula de levadura alteradora.

En una realización, la célula de levadura comprende además:

e) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5) heteróloga;
f) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una glicerol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.6) heteróloga; y
g) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una dihidroxiacetona cinasa E.C. 2.7.1.28 o E.C. 2.7.1.29) homóloga o heteróloga.

La célula de levadura alteradora puede ser haploide, diploide o poliploide. En cepas diploides o poliploides, en una realización, las características a) a g) pueden estar presentes individualmente o en cualquier combinación en un alelo de la cepa diploide o poliploide. En otra realización pueden estar en todos los alelos. Para cepas poliploides, las características a) a g) pueden estar presentes individualmente o en cualquier combinación en una mayoría de los alelos o, como alternativa en una minoría de los alelos.

Estas características y otras realizaciones de la invención se describen a continuación en este documento en mayor detalle.

a) Una alteración de una o más aldehído deshidrogenasas (E.C. 1.2.1.4) nativas de la levadura

La enzima que se altera de acuerdo con la invención es una aldehído deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.4) nativa de la levadura.

En una realización, la aldehído deshidrogenasa nativa de la levadura es acetaldehído deshidrogenasa-6 (*ALD6*).

ALD6 es en este documento cualquier enzima activada por Mg2+ que cataliza la deshidrogenación de acetaldehído en acetato y viceversa.

La reacción de *ALD6* es:

Acetaldehído <-----*ALD6*-----> acetato (1)

Sin limitarse al alcance de la invención, la siguiente explicación puede darse en retrospectiva. Como se muestra en los ejemplos, un modelo matemático confirmó que disminuir la demanda del ATP de mantenimiento aumentará las tasas de conversión de glúcido en etanol (véase el ejemplo 1). Una fuente posible de recambio del ATP de mantenimiento es el ciclo fútil. Para posibilitar la conversión de acetato en etanol se introdujo una acetaldehído deshidrogenasa acetilante (por ejemplo, *adhE* o *acdH*) en las cepas (véanse los documentos WO 2015028583 y WO 2015028582). Esto introdujo también un posible ciclo fútil en las cepas, véase la figura 4.

La figura 1 muestra un resumen esquemático de las rutas metabólicas implicadas en el ciclo fútil de acetaldehído-acetato-acetil-CoA, que causa un ATP de mantenimiento aumentado. El ciclo fútil se indica por flechas discontinuas. La acetaldehído deshidrogenasa acetilante (adhE, acdH) se introdujo en la cepa para posibilitar la conversión de acetato en etanol.

La alteración del ciclo fútil dio lugar a disminución del ATP de mantenimiento y, de este modo, una mejora en la conversión de glucosa y xilosa en etanol en el ejemplo 1. La diana para la alteración del ciclo fútil es la enzima que cataliza la conversión de acetaldehído en acetato en el citoplasma (ALD6). La ACS o acetaldehído deshidrogenasa acetilante no puede ser una diana para la alteración del ciclo fútil porque estas enzimas son parte de la ruta de conversión de acetato en etanol.

En una realización de la invención, la célula de levadura es una cepa en la que la expresión reducida de *ALD6* en la variante de levadura se logra por un medio seleccionado del grupo que consiste en alteración del gen ALD6 y expresión del ARN de antisentido complementario al ARNm de *ALD6*.

En una realización de la invención, la célula de levadura es una alteradora de *ALD6* de *Saccharomyces cerevisiae.*

En otra realización, la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae* YD01247ΔALD6 o YD01248ΔALD6. Se dan secuencias nucleotídicas de ALD6 adecuadas para su alteración con identidad con la secuencia nucleotídica de ALD6 de *Saccharomyces cerevisiae* en otras levaduras en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de ALD6 adecuadas para alteración que se produce en diferentes tipos de levadura

Secuencia y organismo	**Número de acceso**	**% de ID**
Aldehído deshidrogenasa (NADP(+)) ALD6 [*Saccharomyces cerevisiae* S288c]	NP_015264.1	100
Ald6p [*Saccharomyces cerevisiae* AWRI796]	EGA72659.1	99
Aldehído deshidrogenasa 6 [*Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii*]	CCD31406.1	97
Proteína hipotética NDAI_0E02900 [*Naumovozyma dairenensis* CBS 421]	XP_003670350.1	80
Aldehído deshidrogenasa activada por magnesio [*Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042]	BAP69922.1	74
Aldehído deshidrogenasa (NAD+) [*Wickerhamomyces ciferrii*]	XP_011273253.1	63
Aldehído deshidrogenasa [*Brettanomyces bruxellensis* AWRI1499] [*Dekkera bruxellensis* AWRI1499]	EIF46557.1	56

b) Acetaldehído deshidrogenasa (acetilante) (EC 1.2.1.10).

La célula de la invención comprende además un gen exógeno que codifica una enzima con la capacidad de reducir la acetil-CoA en acetaldehído, que es un gen que confiere a la célula la capacidad de convertir acetil-CoA (y/o ácido acético) en etanol. Una enzima con la capacidad de reducir la acetil-CoA en acetaldehído en este documento se entiendo como una enzima que cataliza la reacción (ACDH; EC 1.2.1.10):

$$\text{acetaldehído} + NAD^+ + \text{coenzima A} \rightleftharpoons \text{acetil-coenzima A} + NADH + H^+. \qquad (2)$$

Por tanto, la enzima cataliza la conversión de acetil-CoA en acetaldehído (y viceversa) y también se denomina acetaldehído deshidrogenasa (dependiente de NAD acetilante) o acetil-CoA reductasa. La enzima puede ser una enzima bifuncional que cataliza además la conversión de acetaldehído en etanol (y viceversa; véase a continuación). Por motivos de conveniencia, se hará referencia en este documento a una enzima que tiene al menos la capacidad de reducir acetil-CoA en acetaldehído o etanol como una "acetaldehído deshidrogenasa". Se entiende además en este documento que la célula tiene actividades de alcohol deshidrogenasa endógenas que permiten que la célula, que está provista de actividad de acetaldehído deshidrogenasa, complete la conversión de acetil-CoA en etanol. Además, la célula tiene acetil-CoA sintetasa endógena o exógena, que permite que la célula, que está provista de actividad de acetaldehído deshidrogenasa, complete la conversión de ácido acético (mediante acetil-CoA) en etanol.

El gen exógeno puede codificar una enzima monofuncional que tiene únicamente actividad de acetaldehído deshidrogenasa (es decir una enzima que tiene únicamente la capacidad de reducir acetil-CoA en acetaldehído) tal como, por ejemplo, la acetaldehído deshidrogenasa codificada por el gen mhpF de *E. coli*. Ejemplos adecuados de procariotas que comprenden enzimas monofuncionales con actividad de acetaldehído deshidrogenasa se proporciona en la tabla 2. Las secuencias de aminoácidos de estas enzimas monofuncionales están disponibles en bases de datos públicas y pueden usarse por los expertos en la materia para diseñar secuencias nucleotídicas de codones optimizados que codifican la enzima monofuncional correspondiente.

Tabla 2: Enzimas adecuadas con actividad de acetaldehído deshidrogenasa e identidad con mhpF de *E. coli*

Secuencia y organismo	**Identidad de aminoácidos (%)**
Escherichia coli cepa K12 subcepa MG1655	100 %
Shigella sonnei	100 %
Escherichia coli IAI39	99 %
Citrobacter youngae ATCC 29220	93 %
Citrobacter sp. 30_2	92 %
Klebsiella pneumoniae 342)	87 %
Klebsiella variicola	87 %
Pseudomonas putida	81 %
Ralstonia eutropha JMP134	82 %
Burkholderia sp. H160	81 %
Azotobacter vinelandii DJ	79 %
Ralstonia metallidurans CH34	70 %
Xanthobacter autotrophicus Py2	67 %
Burkholderia cenocepacia J2315	68 %
Frankia sp. EAN1pec	67 %
Polaromonas sp. JS666	68 %
Burkholderia phytofirmans PsJN	70 %
Rhodococcus opacus B4	64 %

En una realización, la célula comprende un gen exógeno que codifica una enzima bifuncional con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, que es un gen que confiere a la célula la capacidad de convertir acetil-CoA en etanol. La ventaja de usar una enzima bifuncional con actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa en oposición a enzimas separadas para cada una de las actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, es que permite canalizar directamente el intermedio entre las enzimas que catalizan reacciones consecutivas en una ruta, lo que ofrece la posibilidad de un medio eficaz, exclusivo y protegido de suministro de metabolitos. La canalización de sustrato, por tanto, disminuye el tiempo de tránsito de los intermedios, evita la pérdida de intermedios por difusión, protege a los intermedios inestables del disolvente e impide la entrada de intermedios en rutas metabólicas competidoras. La enzima bifuncional, por lo tanto, permite una conversión más eficaz de acetil-CoA en etanol en comparación con las enzimas acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa separadas. Una ventaja adicional de usar la enzima bifuncional es que también puede usarse en células que tengan poca o ninguna actividad de alcohol deshidrogenasa en las condiciones usadas, tal como, por ejemplo, condiciones anaeróbicas y/o condiciones de represión por catabolitos.

Las enzimas bifuncionales con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa son procariotas y protozoos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las enzimas bifuncionales codificadas por los genes adhE de *Escherichia coli* y ADH2 de *Entamoeba histolytica* (véase, por ejemplo, Bruchaus y Tannich, 1994, J. Biochem. 303: 743-748; Burdette y Zeikus, 1994, J. Biochem. 302: 163-170; Koo *et al*., 2005, Biotechnol. Lett. 27: 505-510; Yong *et al*., 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93: 6464-6469). Las enzimas bifuncionales con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa son proteínas más grandes que consisten en aproximadamente de 900 aminoácidos y son bifuncionales porque muestran, tanto actividad de acetaldehído deshidrogenasa (ACDH; EC 1.2.1.10) como actividad de alcohol deshidrogenasa (ADH; EC 1.1.1.1). adhE de *E. coli* y ADH2 de *Entamoeba histolytica* muestran un 45 % de identidad de aminoácidos.

Tabla 3: Enzimas bifuncionales adecuadas con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa e identidad con adhE de *E. coli*

Secuencia y organismo	**Identidad de aminoácidos (%)**
Escherichia coli O157:H7 cepa Sakai	100 %
Shigella sonnei	100 %
Shigella dysenteriae 1012	99 %
Klebsiella pneumoniae 342	97 %
Enterobacter sp. 638	94 %
Yersinia pestis biovariedad *Microtus* cepa 91001	90 %
Serratia proteamaculans 568	90 %
Pectobacterium carotovorum WPP14	90 %
Sodalis glossinidius cepa 'morsitans'	87 %
Erwinia tasmaniensis Et1/99	86 %
Aeromonas hydrophila ATCC 7966	81 %
Vibrio vulnificus YJ016]	76 %

Tabla 4: Enzimas bifuncionales adecuadas con actividad de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa e identidad con ADH2 de *Entamoeba histolytica*

Secuencia y organismo	**Identidad de aminoácidos (%)**
Entamoeba histolytica HM-1: IMSS	99 %
Entamoeba dispar SAW760	98 %
Mollicutes bacterium D7	65 %
Fusobacterium mortiferum ATCC 9817	64 %
Actinobacillus succinogenes 130Z	63 %
Pasteurella multocida Pm70	62 %
Mannheimia succiniciproducens MBEL55E	61 %
Streptococcus sp. 2_1_36FAA]	61 %

Para la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima bifuncional que tiene actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, o la enzima que tiene actividad de acetaldehído deshidrogenasa, la secuencia nucleotídica (a expresar) se coloca en una construcción de expresión en la que está unida de forma funcional a regiones/secuencias reguladores de la expresión adecuadas para asegurar la expresión de la enzima tras la transformación de la construcción de expresión en la célula de la invención (véase anteriormente). Los promotores adecuados para la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima que tiene la enzima bifuncional que tiene actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, o la enzima que tiene actividad de acetaldehído deshidrogenasa incluyen promotores que son preferiblemente insensibles a la represión por catabolitos (glucosa), que son activos en condiciones anaeróbicas y/o que no requieren preferiblemente xilosa o arabinosa para la inducción. Anteriormente se dan ejemplos de dichos promotores.

Preferiblemente, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima bifuncional que tiene actividades de acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, o la enzima que tiene actividad de acetaldehído deshidrogenasa se adapta para optimizar su uso de codones con el de la célula en cuestión (como se describe anteriormente).

c) Acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1);

La célula de la invención comprende un gen que codifica una enzima que tiene la actividad específica de acetil-CoA sintetasa. La acetil-CoA sintetasa o acetato-CoA ligasa es una enzima (EC 6.2.1.1) implicada en el metabolismo del carbono de los glúcidos. Está en la clase de enzimas ligasa, que significa que cataliza la formación de un nuevo enlace químico entre dos moléculas grandes.

Las dos moléculas unidas por acetil-CoA sintetasa son acetato y coenzima A (CoA). La reacción completa con todos los sustratos y productos incluidos es:

$$\text{ATP} + \text{acetato} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{pirofosfato} + \text{acetil-CoA} \qquad (3)$$

La forma *Acs1* de la acetil-CoA sintetasa está codificada por el gen *ACS1,* que se activa por acetato y se desactiva por glucosa. La forma *Acs2* de la acetil-CoA sintetasa está codificada por el gen ACS2, que se activa por acetato y se desactiva por glucosa.

Ejemplos adecuados de enzimas con actividad de acetil-CoA sintetasa se proporcionan en la tabla 5.

Tabla 5: ACS adecuadas con identidad con la proteína Acs2 de *Saccharomyces cerevisiae.*

Secuencia y organismo	**Identidad (%)**	**Número de acceso**
acetato-CoA ligasa ACS2 [*Saccharomyces cerevisiae* S288c]	100	NP_013254.1
acetil CoA sintetasa [*Saccharomyces cerevisiae* YJM789]	99	EDN59693.1
acetato-CoA ligasa [*Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140]	85	XP_453827.1
acetato-CoA ligasa [*Candida glabrata* CBS 138]	83	XP_445089.1
acetato-CoA ligasa [*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054]	68	XP_001385819.1
acetil-coenzima A sintetasa FacA [*Aspergillus fumigatus* A 1163]	63	EDP50475.1
acetato-CoA ligasa facA-*Penicillium chrysogenum* [*Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255]	62	XP_002564696.1

d) Una modificación que da lugar a reducción de la actividad de 3-fosfato fosfohidrolasa y/o glicerol 3-fosfato deshidrogenasa

La célula de levadura alteradora puede comprender además una modificación que puede dar lugar a reducción de la actividad de glicerol 3-fosfato fosfohidrolasa y/o glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, en comparación con la levadura alteradora sin dicha modificación.

En esa realización, la célula puede comprender una alteración de una o más secuencias nucleotídicas endógenas que codifican un gen de glicerol 3-fosfato fosfohidrolasa y/o que codifica un gen de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa.

En dicha realización, la actividad enzimática necesaria para la síntesis de glicerol dependiente de NADH se reduce o elimina. La reducción o eliminación de esta actividad enzimática puede conseguirse modificando uno o más genes que codifican una actividad de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) dependiente de NAD o uno o más genes que codifican una actividad de glicerolfosfato fosfatasa (GPP), de modo que la enzima se expresa considerablemente menos que en el tipo silvestre o de modo que el gen codifique un polipéptido con actividad reducida.

Dichas modificaciones pueden realizarse usando técnicas bioquímicas normalmente conocidas, y en particular pueden incluir una o más mutaciones de supresión o mutagénesis dirigida al sitio de regiones promotores o regiones codificantes de los genes estructurales que codifican GPD y/o GPP. Como alternativa, pueden obtenerse cepas de levadura que son defectuosas en la producción glicerol por mutagénesis aleatoria seguida de selección de cepas con actividad reducida o ausente de GPD y/o GPP. Los genes *GPD1, GPD2, GPP1* y *GPP2* de *S. cerevisiae* se muestran en el documento WO 2011010923 y se divulgan en las SEQ ID NO: 24-27 de esa solicitud.

Por tanto, en las células de la invención, puede reducirse el gen específico de glicerol 3-fosfato fosfohidrolasa y/o que codifica una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. En las células de la invención, la actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa especifica se reduce preferiblemente en al menos un factor de 0,8, 0,5, 0,3, 0,1, 0,05 o 0,01 en comparación con una cepa que es genéticamente idéntica excepto por la modificación genética que causa la reducción en la actividad específica, preferiblemente en condiciones anaeróbicas. La actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa puede determinarse como describe por Overkamp *et al.* (2002, Yeast 19:509-520).

Un gen preferido que codifica una glicerolfosfato deshidrogenasa cuya actividad tiene que reducirse o inactivarse en la célula de la invención es *GPD1* de *S. Cerevisiae* como se describe por van den Berg y Steensma (1997, Yeast 13:551-559), que codifica la secuencia de aminoácidos de GPD1 y ortólogos de la misma en otras especies.

Ejemplos adecuados de organismos (hospedadores) que comprenden una enzima con actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa que pertenece al género *Saccharomyces, Naumovozyna, Candida Vanderwaltozyma* y *Zygosaccharomyces* se proporcionan en la tabla 6.

Tabla 6: Enzimas con actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa (GPD1)

Secuencia y organismo	**Identidad de aminoácidos (%)**
S. cerevisiae	100 %
Naumovozyma dairenensis	79 %
Naumovozyma castellii	80 %
Candida glabrata	77 %
Vanderwaltozyma polyspora	77 %
Zygosaccharomyces rouxii	74 %
Saccharomycopsis *fibuligera*	61 %

Sin embargo, en algunas cepas, por ejemplo, de *Saccharomyces, Candida* y *Zygosaccharomyces*, un segundo gen que codifica una glicerolfosfato deshidrogenasa está activo, es decir, *GPD2,* véase, por ejemplo, Overkamp *et al.* (2002, *supra*). Otro gen preferido que codifica una glicerolfosfato deshidrogenasa cuya actividad tiene que reducirse o inactivarse en la célula de la invención, por lo tanto, es *GPD2* de *S. cerevisiae* como se describe por Overkamp *et al.* (2002, *supra*), que codifica la secuencia de aminoácidos de GPD2 u ortólogos de la misma en otras especies.

Ejemplos adecuados de organismos (hospedadores) que comprenden una enzima con actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa que pertenece al género (Zygo) *Saccharomyces* y *Candida* se proporcionan en la tabla 7.

Tabla 7: Enzimas con actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa (GPD2)

Secuencia y organismo	**Identidad de aminoácidos (%)**
S. cerevisiae	100 %
Candida glabrata	75 %
Zygosaccharomyces rouxii	73 %
Spathaspora passalidarum	62 %
Scheffersomyces stipitis	61 %

En una realización, la célula es una levadura en la que el genoma de la célula de levadura comprende una alteración en al menos un gen seleccionado del grupo de *GPD1, GPD2, GPP1* y *GPP2.*

e) Xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5)

En una realización, la célula de levadura alteradora comprende una xilosa isomerasa ((E.C. 5.3.1.5); *xylA*).

Una "xilosa isomerasa" (E.C. 5.3.1.5) se define en este documento como una enzima que cataliza la isomerización directa de D-xilosa en D-xilulosa y/o viceversa. La enzima también se conoce como D-xilosa cetoisomerasa. Una xilosa isomerasa en este documento también puede catalizar la conversión entre D-glucosa y D-fructosa (y, por consiguiente, puede denominarse, por lo tanto, glucosa isomerasa). En general, una xilosa isomerasa requiere un catión bivalente, tal como magnesio, manganeso o cobalto como cofactor.

f) Glicerol deshidrogenasa (EC 1.1.1.6)

Una glicerol deshidrogenasa en este documento se entiende como una enzima que cataliza la reacción química (EC 1.1.1.6):

$$\text{glicerol} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{glicerona} + NADH + H^+ \qquad (4)$$

Otros nombres de uso común incluyen glicerina deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa ligada a NAD^+ y glicerol:NAD+ 2-oxidorreductasa. Preferiblemente, la modificación genética causa sobreexpresión de una glicerol deshidrogenasa, por ejemplo, por sobreexpresión de una secuencia nucleotídica que codifica una glicerol deshidrogenasa. La secuencia nucleotídica que codifica la glicerol deshidrogenasa puede ser endógena a la célula o puede ser una glicerol deshidrogenasa que es heteróloga a la célula. Las secuencias nucleotídicas que pueden alterarse en las células de la invención son, por ejemplo, el gen de la glicerol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (*GCY1*) como se describe, por ejemplo, por Oechsner *et al.* (1988, FEBS Lett. 238: 123-128) o Voss *et al.* (1997, Yeast 13: 655-672).

g) Una o más secuencias nucleotídicas que codifican una dihidroxiacetona cinasa (E.C. 2.7.1.28 o E.C. 2.7.1.29) homóloga o heteróloga

una dihidroxiacetona cinasa en este documento se entiende como una enzima que cataliza una de las reacciones químicas:

EC 2.7.1.28 ATP + D-gliceraldehído <=> ADP + D-gliceraldehído 3-fosfato

EC 2.7.1.29 ATP + glicerona[1] <=> ADP + glicerona fosfato

[1]glicerona = dihidroxiacetona

Otros nombres de uso común incluyen glicerona cinasa, ATP:glicerona fosfotransferasa y acetolcinasa (fosforilante). Se entiende que la glicerona y la dihidroxiacetona son la misma molécula. Preferiblemente, la modificación genética causa sobreexpresión de una dihidroxiacetona cinasa, por ejemplo, por sobreexpresión de una secuencia nucleotídica que codifica una dihidroxiacetona cinasa. La secuencia nucleotídica que codifica la dihidroxiacetona cinasa puede ser endógena a la célula o puede ser una dihidroxiacetona cinasa que es heteróloga a la célula. Las secuencias nucleotídicas que puede usarse para la sobreexpresión de dihidroxiacetona cinasa en las células de la invención son, por ejemplo, los genes de dihidroxiacetona cinasa de *S. cerevisiae* (*DAK1*) y (*DAK2*) como se describe, por ejemplo, por Molin *et al.* (2003, J. Biol. Chem. 278:1415-1423).

Ejemplos adecuados de enzimas con actividad de glicerol deshidrogenasa se proporcionan en la tabla 8.

Tabla 8: *GCY* adecuadas con identidad con la proteína de *Gcy1* de GCY1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Secuencia y organismo	**Identidad (%)**	**Número de acceso**
Gcy1p [*Saccharomyces cerevisiae* S288c]	100 %	NP_014763.1
Proteína de tipo GCY1 [*Saccharomyces kudriavzevii* IFO 1802]	89 %	EJT43197.1
Proteína hipotética KNAG_0C04910 [*Kazachstania naganishii* CBS 8797]	69 %	CCK69592.1
Ypr1p [*Saccharomyces cerevisiae* S288c]	65 %	NP_010656.1
Aldo/cetorreductasa [*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054] >gb|ABN65453.1	55 %	XP_001383482.1

Ejemplos adecuados de enzimas con actividad de dihidroxiacetona cinasa se proporcionan en la tabla 9.

Tabla 9: *DAK* adecuadas con identidad con la proteína de *Dak1* de *Saccharomyces cerevisiae.*

Secuencia y organismo	**Identidad (%)**	**Número de acceso**
Dak1p [*Saccharomyces cerevisiae* S288c]	100	NP_013641.1
Dihidroxiacetona cinasa [*Saccharomyces cerevisiae* YJM789]	99	EDN64325.1
Proteína del tipo DAK1 [*Saccharomyces kudriavzevii* IFO 1802]	95	EJT44075.1
ZYBA0S11-03576g1_1 [*Zygosaccharomyces bailii* CLIB 213]	77	CDF91470.1
Proteína hipotética [*Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140]	70	XP_451751.1
Proteína hipotética [*Candida glabrata* CBS 138]	63	XP_449263.1
Dak2p [*Saccharomyces cerevisiae* S288c]	44	NP_116602.1

Las realizaciones de la invención se describen ahora en mayor detalle.

En una realización, la célula de levadura tiene una tasa de producción global de etanol que es al menos aproximadamente un 20 % mayor, al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 100 % mayor que la de la levadura de tipo silvestre correspondiente.

La invención se refiere además al uso de una alteración de uno o más *ALD6* en levadura, que da lugar a la eliminación de un ciclo de consumo de ATP fútil en la levadura.

La presente invención es una célula de levadura que fermenta pentosa en mezclas de glúcidos que también contienen glucosa a una tasa mayor que la levadura de tipo silvestre correspondiente, estando caracterizada la célula de levadura por expresión reducida de *ALD6*.

La presente invención también es un método de producción de etanol a partir de la fermentación de penosa, que comprende la etapa de: cultivar una célula de levadura en un material que contiene pentosa en condiciones

adecuadas de fermentación durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la fermentación de pentosa en etanol, pudiendo la variante de levadura fermentar pentosa a una tasa mayor con respecto a la levadura de tipo silvestre correspondiente y teniendo expresión reducida de *ALD6*.

En otra realización alternativa de la levadura alteradora, la región promotora para *ALD6* funcional se remplaza por un promotor que responde a oxígeno disminuido regulando por disminución la expresión del gen *ALD6*.

En una realización alternativa de la levadura alteradora, la expresión de *ALD6* puede regularse por disminución mediante el uso de una construcción de antisentido en que parte o toda la hebra de antisentido que codifica *ALD6* se expresa bajo la regulación de un promotor que responde a oxígeno disminuido. En esta realización, el ARNm de antisentido para *ALD6* se expresa en condiciones limitantes de oxígeno y, de este modo, inactiva *ALD6* funcional.

La célula de levadura de la presente invención es un alterador de *ALD6*. Por un alterador de *ALD6*, se entiende una variante en que una parte o todo el gen nativo se elimina o remplaza con ADN cuya expresión no produce un producto de expresión que tiene ninguna función de *ALD6* nativo.

Por levadura "de tipo silvestre", se entiende una cepa de levadura fermentadora de pentosa con niveles normales de *ALD6* funcional a partir de la que se obtiene la célula de levadura de la presente invención. En determinados casos, la "levadura de tipo silvestre" como se define en esta solicitud de patente, puede incluir levadura mutagenizada. Por ejemplo, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* YD01247 y YD01248, es por sí misma una cepa de levadura mutada. Sin embargo, YD01247 o YD01248 también es una levadura de tipo silvestre, como se define en este documento, porque es una levadura fermentadora de pentosa con niveles normales de *ALD6* funcional que se usó para desarrollar una célula de levadura de la presente invención.

De acuerdo con los ejemplos, la alteración de la actividad *ALD6* nativa da lugar a un tiempo de fermentación más corto en la fermentación de C5/C6 y/o al consumo conjunto por la célula de levadura de pentosa y glucosa.

Las células de levadura resultantes, en los ejemplos, denominadas YD1247ΔALD6 y YD1248ΔALD6 se obtuvieron y se han caracterizado como se describe en detalle a continuación en los ejemplos. Se prevé que una célula de levadura de *S. cerevisiae* caracterizada por expresión reducida del gen *ALD6* funcional y rendimiento de etanol global aumentado puede obtenerse por un medio distinto de eliminación del gen *ALD6* mediante integración específica de sitio de una etapa usando un casete de alteración. Por ejemplo, podría obtenerse una variante que carezca de *ALD6* funcional, o que exprese *ALD6* a un nivel reducido, por cualquiera de varios medios conocidos en la técnica, tales como exposición de las células de levadura a agentes intercalantes de ADN o irradiando las células de levadura con luz ultravioleta. Es probable que las células deficientes de *ALD6* pudieran distinguirse de las células de tipo silvestre basándose en el tamaño de la colonia y otros patrones morfológicos (es decir, tamaño pequeño, colonias amarillas con un aspecto arrugado). El estado de *ALD6* de las colonias deficientes de *ALD6* putativas presumiblemente identificadas basándose en este fenotipo único podría confirmarse por, por ejemplo, determinaciones de actividad de *ALD6*.

La célula de levadura alteradora típicamente contiene genes de una ruta metabólica de pentosa no nativos de la levadura y/o que permiten que la célula de levadura convierta una o más pentosas. En una realización, la célula de levadura puede comprender una o dos o más copias de una o más xilosa isomerasas y/o una o dos o más copias de uno o más genes de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, permitiendo que la célula de levadura convierta xilosa. En una realización de la misma, estos genes pueden integrarse en el genoma de la célula de levadura. En otra realización, la célula de levadura comprende los genes *araA, araB* y *araD.* Entonces puede fermentar arabinosa. En una realización de la invención, la célula de levadura comprende el gen *xylA*, el gen *XYL1* y el gen *XYL2* y/o el gen *XKS1*, para permitir que la célula de levadura fermente xilosa; eliminación del gen de la aldosa reductasa (GRE3); sobreexpresión de genes PPP, *TAL1, TKL1, RPE1* y *RKI1* para permitir el aumento del flujo a través de la ruta de pentosa fosfato en la célula, y/o sobreexpresión de GAL2 y/o eliminación de GAL80. Por tanto, a través de la inclusión de los genes anteriores, puede introducirse una o más rutas adecuadas de pentosa u otras rutas metabólicas en la célula de levadura que no eran nativas de la célula de levadura (de tipo silvestre). De acuerdo con una realización, pueden introducirse los siguientes genes en la célula de levadura alteradora mediante su introducción en una célula hospedadora:

1) un grupo que consiste en los genes PPP *TAL1, TKL1, RPE1* y *RKI1,* opcionalmente bajo el control de un promotor constitutivo fuerte;
2) un grupo que consiste en un gen *xylA* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte;
3) un grupo que comprende un gen *XKS1* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte,
4) un grupo que consiste en los genes *araA, araB* y *araD* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte
5) eliminación de un gen de la aldosa reductasa

Las células alteradoras anteriores pueden construirse usando técnicas de expresión recombinante conocidas. La alteración de ALD6 puede lograrse antes, simultáneamente o después de cualquiera de las modificaciones 1)-5).

La célula de levadura de acuerdo con la invención puede someterse a ingeniería evolutiva para mejorar sus propiedades. Los procesos de ingeniería evolutiva son procesos conocidos. La ingeniería evolutiva es un proceso en el que fenotipos industrialmente relevantes de un microorganismo, en este documento la levadura, pueden acoplarse a la tasa de crecimiento específica y/o la afinidad por un nutriente, mediante un proceso de selección natural de configuración racional. La ingeniería evolutiva se describe, por ejemplo, en detalle en Kuijper, M, *et al.,* FEMS Yeast Research 5(2005) 925-934, documentos WO 2008041840 y WO 2009112472. Después de la ingeniería evolutiva, se aísla la célula de levadura fermentadora de pentosa resultante. El aislamiento puede ejecutarse de cualquier manera conocida, por ejemplo, por separación de células de un caldo de células de levadura usado en la ingeniería evolutiva, por ejemplo, tomando una muestra celular o por infiltración o centrifugación.

En una realización, las células de levadura no tienen marcador. Como se usa en este documento, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección de, o el cribado de, una célula hospedadora que contiene el marcador. Sin marcador significa que los marcadores están esencialmente ausentes en la célula de levadura. Estar sin marcador es particularmente ventajoso cuando se han usado marcadores antibióticos en la construcción de la célula de levadura y se eliminan después de ello. La eliminación de marcadores puede hacerse usando cualquier técnica adecuada de la técnica anterior, por ejemplo, recombinación intramolecular.

En una realización, la célula de levadura industrial se construye basándose en una célula hospedadora tolerante a inhibidor, en la que la construcción se realiza como se describe posteriormente en este documento. Las células hospedadoras tolerantes a inhibidor pueden seleccionarse cribando cepas para su crecimiento sobre materiales que contienen inhibidores, tal como se ilustra en Kadar *et al.,* Appl. Biochem. Biotechnol. (2007), Vol. 136-140, 847-858, en el que se seleccionó una cepa de *S. cerevisiae* ATCC 26602 tolerante a inhibidor.

La célula de levadura puede comprender además aquellas actividades enzimáticas necesarias para la conversión de piruvato en un producto de fermentación deseado, tal como etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama o una cefalosporina.

En una realización, la célula de levadura se obtiene de una levadura industrial. Una célula industrial y célula de levadura industrial puede definirse de la siguiente manera. Los entornos vivos de células (de levadura) en procesos industriales son significativamente diferentes de los de laboratorio. Las células de levadura industriales deben poder funcionar bien en múltiples condiciones ambientales que pueden variar durante el proceso. Dichas variaciones incluyen cambio en las fuentes de nutrientes, pH, concentración de etanol, temperatura, concentración de oxígeno, etc., que conjuntamente tienen impacto potencial sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae.* En condiciones industriales adversas, las cepas tolerantes al medio ambiente deben permitir un crecimiento y producción robustos. Las cepas de levadura industriales en general son más robustas hacia estos cambios en condiciones ambientales que pueden producirse en las aplicaciones en que se usan, tal como en la industria panadera, la industria cervecera, la fabricación de vino y la industria de etanol. En una realización, la célula de levadura industrial se construye basándose en una célula hospedadora industrial, en la que la construcción se realiza como se describe posteriormente en este documento. Ejemplos de levadura industrial (*S. cerevisiae*) son Ethanol Red® (Fermentis) Fermiol® (DSM) y Thermosacc® (Lallemand).

Las células de levadura de acuerdo con la invención son preferiblemente tolerantes a inhibidor, es decir, pueden resistir inhibidores comunes al nivel que tienen típicamente con condiciones de pretratamiento e hidrólisis comunes, de modo que las células de levadura pueden encontrar amplia aplicación, es decir, tienen alta aplicabilidad para diferentes materias primas, diferentes métodos de pretratamiento y diferentes condiciones de hidrólisis. En una realización, la célula de levadura es tolerante a inhibidor. La tolerancia a inhibidor es resistencia a compuestos inhibidores. La presencia y nivel de compuestos inhibidores en lignocelulosa puede variar ampliamente con la variación de la materia prima, el método de pretratamiento y el proceso de hidrólisis. Ejemplos de categorías de inhibidores son ácidos carboxílicos, furanos y/o compuestos fenólicos. Ejemplos de ácidos carboxílicos son ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico. Ejemplos de furanos son furfural e hidroximetilfurfural. Ejemplos de compuestos fenólicos son vainillina, ácido siríngico, ácido ferúlico y ácido cumárico. Las cantidades típicas de inhibidores para ácidos carboxílicos son: varios gramos por litro, hasta 20 gramos por litro o más, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis. Para furanos: varios cientos de miligramos por litro hasta varios gramos por litro, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis. Para compuestos fenólicos: varias decenas de miligramos por litro, hasta un gramo por litro, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis.

En una realización, la célula de levadura es una célula que tiene capacidad natural de fermentación alcohólica, preferiblemente, fermentación alcohólica anaeróbica. Una célula de levadura preferiblemente tiene una alta tolerancia a etanol, una alta tolerancia a bajo pH (es decir, tiene capacidad de crecimiento a un pH inferior a aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2,5) y hacia compuestos orgánicos y/o una alta tolerancia a elevadas temperaturas.

Cualquiera de las características o actividades anteriores de una célula de levadura puede estar presente de forma natural en la célula o puede introducirse o modificarse por modificación genética.

Expresión recombinante

La célula de levadura es una célula recombinante. Es decir, una célula de levadura comprende, o se transforma con o se modifica genéticamente con una secuencia nucleotídica que no existe de forma natural en la célula en cuestión.

Las técnicas para la expresión recombinante de enzimas en una célula, así como para las modificaciones genéticas adicionales de una célula de levadura son bien conocidas para los expertos en la materia. Típicamente, dichas técnicas implican transformación de una célula con construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia relevante. Dichos métodos son conocidos, por ejemplo, de los manuales convencionales, tales como Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3.ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, o F. Ausubel *et al*., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987). Los métodos para transformación y modificación genética de células hospedadoras fúngicas con conocidos de los documentos, por ejemplo, EP-A-0635574, WO 98/46772, WO 99/60102, WO 00/37671, WO 90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 y US 6265186.

Producción de bioproductos

A lo largo de los años, se han hecho sugerencias para la introducción de diversos organismos para la producción de bioetanol a partir de glúcidos de cultivo. En la práctica, sin embargo, todos los procesos de producción de bioetanol principales han seguido usando las levaduras del género *Saccharomyces* como productor de etanol. Esto se debe a las muchas características atractivas de especies de *Saccharomyces* para procesos industriales, es decir, una alta tolerancia a ácidos, etanol y osmotolerancia, capacidad de crecimiento anaeróbico y, por supuesto, su alta capacidad fermentativa alcohólica. Especies de levadura preferidas como células hospedadoras incluyen *S. cerevisiae, S. bulderi, S. barnetti, S. exiguus, S. uvarum, S. diastaticus, K. lactis, K. marxianus* o *K. fragilis.*

Una célula de levadura puede ser una célula adecuada para producción de etanol. Una célula de levadura puede ser adecuada, sin embargo, para la producción de productos de fermentación distintos de etanol.

Dichos productos de fermentación no etanólicos incluyen, en principio, cualquier compuesto químico voluminoso o fino que se pueda producir por un microorganismo eucariota tal como una levadura o un hongo filamentoso.

Una célula de levadura preferida para la producción de productos de fermentación no etanólicos es una célula hospedadora que contiene una modificación genética que provoca actividad de alcohol deshidrogenasa disminuida.

Lignocelulosa

La lignocelulosa, que puede considerare una materia prima renovable potencial, en general comprende los polisacáridos celulosa (glucanos) y hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algo de hemicelulosa puede estar presente como glucomananos, por ejemplo, en materias primas derivadas de madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos en glúcidos solubles, incluyendo tanto monómeros como multímeros, por ejemplo, glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas se produce bajo la acción de diferentes enzimas que actúan en concierto.

Además, las pectinas y otras sustancias pépticas tales como arabinanos pueden componer una proporción considerable de la masa seca de típicamente paredes celulares de tejidos vegetales no leñosos (de aproximadamente un cuarto a la mitad de la masa seca pueden ser pectinas).

Pretratamiento

Antes del tratamiento enzimático, el material lignocelulósico puede pretratarse. El pretratamiento puede comprender la exposición del material lignocelulósico a un ácido, una base, un disolvente, calor, un peróxido, ozono, fragmentación mecánica, trituración, molienda o despresurización rápida, o una combinación de dos cualesquiera o más de los mismos. Este pretratamiento químico a menudo se combina con pretratamiento térmico, por ejemplo, entre 150-220 °C durante 1 a 30 minutos.

Hidrólisis enzimática

El material pretratado se somete habitualmente a hidrólisis enzimática para liberar glúcidos que pueden fermentarse de acuerdo con la invención. Esto puede ejecutarse con métodos convencionales, por ejemplo, contacto con celulasas, por ejemplo, una o más celobiohidrolasas, una o más endoglucanasas, una o más betaglucosidasas y opcionalmente otras enzimas. La conversión con las celulasas puede ejecutarse a temperaturas ambientales y a temperaturas mayores, a un tiempo de reacción para liberar suficientes cantidades de uno o más glúcidos. El

resultado de la hidrólisis enzimática es el producto de hidrólisis que comprende glúcidos C5/C6, en este documento denominado como composición de glúcido.

La composición de glúcido

La composición de glúcido usada de acuerdo con la invención comprende glucosa y una o más pentosas, por ejemplo, arabinosa y/o xilosa. Puede usarse cualquier composición de glúcido en la invención que satisfaga esos criterios. Glúcidos opcionales en la composición de glúcido son galactosa y manosa. En una realización preferida, la composición de glúcido es un hidrolizado de uno o más materiales lignocelulósicos. La lignocelulosa en este documento incluye hemicelulosa y partes de hemicelulosa de biomasa. la lignocelulosa también incluye fracciones lignocelulósicas de biomasa. Pueden encontrarse materiales lignocelulósicos adecuados en la siguiente lista: imprimación de huertos, chaparral, residuos de molienda, residuos de madera urbana, residuos municipales, residuos de tala, aclarado de bosques, cultivos leñosos de rotación corta, residuos industriales, paja de trigo, paja de avena, paja de arroz, paja de cebada, paja de centeno, paja de lino, cáscaras de soja, cáscaras de arroz, paja de arroz, pienso de gluten de maíz, cáscaras de avena, caña de glúcido, rastrojo de maíz, tallos de maíz, mazorcas de maíz, cáscaras de maíz, brotes de césped, miscanto, sorgo dulce, tallos de canola, tallos de soja, pasto de pradera, maicillo, cola de zorro; pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos, cáscaras de semillas, residuos celulósicos de animales, recortes de césped, algodón, algas marinas, árboles, madera blanda, madera dura, álamo, pino, arbustos, pastos, trigo, paja de trigo, bagazo de caña de glúcido, maíz, hojas de maíz, quemados de maíz, granos de maíz, fibra de granos, productos y subproductos de molienda húmeda o seca de cereales, residuos sólidos municipales, residuos de papel, residuos de jardinería, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, residuos de papel, pulpa, residuos de fábricas de papel, ramas, arbustos, cañas, maíz, hojas de maíz, un cultivo energético, bosque, una fruta, una flor, un grano, un césped, un cultivo herbáceo, una hoja, corteza, una aguja, un tronco, una raíz, un retoño, un arbusto, pasto de pradera, un árbol, una hortaliza , piel de fruta, una vid, pulpa de remolacha azucarera, molienda de trigo, cáscaras de avena, madera dura o blanda, material residual orgánico generado de un proceso agrícola, residuos de madera forestal o una combinación de dos cualesquiera o más de los mismos.

Se da un resumen de algunas composiciones de glúcido adecuadas derivadas de lignocelulosa y la composición de glúcido de sus hidrolizados en la tabla 10. Las lignocelulosas enumeradas incluyen: mazorcas de maíz, fibra de maíz, cáscaras de arroz, cáscaras de melón, pulpa de remolacha azucarera, paja de trigo, bagazo de caña de glúcido, madera, césped y prensados de aceitunas.

Tabla 10: Resumen de composiciones de glúcido de materiales lignocelulósicos. Gal=galactosa, Xil=xilosa, Ara=arabinosa, Man=manosa, Glu=glutamato, Ram=ramnosa. Se da el porcentaje de galactosa (% Gal).

Material lignocelulósico	**Gal**	**Xil**	**Ara**	**Man**	**Glu**	**Ram**	**Sum**	**% de Gal.**
Mazorca de maíz a	10	286	36		227	11	570	1,7
Mazorca de maíz b	131	228	160		144		663	19,8
Cáscaras de arroz a	9	122	24	18	234	10	417	2,2
Cáscaras de arroz b	8	120	28		209	12	378	2,2
Cáscaras de melón	6	120	11		208	16	361	1,7
Pulpa de remolacha azucarera	51	17	209	11	211	24	523	9,8
Paja de trigo de Idaho	15	249	36		396		696	2,2
Fibra de maíz	36	176	113		372		697	5,2
Bagazo de caña	14	180	24	5	391		614	2,3
Rastrojo de maíz	19	209	29		370		626	
Athel (madera)	5	118	7	3	493		625	0,7
Eucalipto (madera)	22	105	8	3	445		583	3,8
CWR (césped)	8	165	33		340		546	1,4
JTW (césped)	7	169	28		311		515	1,3
MSW	4	24	5	20	440		493	0,9
Veg. de alpiste rojo	16	117	30	6	209	1	379	4,2
Semillas de alpiste rojo	13	163	28	6	265	1	476	2,7
Residuos de prensado de aceitunas	15	111	24	8	329		487	3,1

Queda claro de la tabla 10 que en estas lignocelulosas está presente una alta cantidad de glúcido en forma de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa. La conversión de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa en producto de fermentación, por tanto, es de gran importancia económica. También está presente manosa en algunos materiales de lignocelulosa que está habitualmente en cantidades inferiores a los glúcidos mencionados previamente. Por lo tanto, ventajosamente también la manosa se convierte por la célula de levadura.

Se espera que las células de levadura de la presente invención puedan manipularse adicionalmente para conseguir otras características deseables, o incluso mayores rendimientos globales de etanol.

La selección de células de levadura mejoradas pasando las células de levadura en medio que contiene hidrolizado ha producido una levadura mejorada con tasas de fermentación potenciadas. Usando los contenidos de la presente invención, se podrían mejorar fácilmente dichas cepas.

Por material que contiene pentosa se entiende cualquier medio que comprenda pentosa, sea líquido o sólido. Los materiales que contienen pentosa incluyen hidrolizados de polisacárido o biomasa lignocelulósica tales como cáscaras de maíz, madera, papel, subproductos agrícolas y similares.

Por un "hidrolizado", como se usa en este documento, se entiende un polisacárido que se ha despolimerizado mediante la adición de agua para formar glúcidos mono y oligosacáridos. Los hidrolizados pueden producirse por hidrólisis enzimática o ácida del material que contiene polisacárido.

Preferiblemente, la célula de levadura puede crecer en condiciones similares a las encontradas en fuentes industriales de pentosa. El método de la presente invención sería más económico cuando el material que contiene pentosa pudiera inocularse con la variante de levadura sin manipulación excesiva. A modo de ejemplo, la industria de fabricación de papel genera grandes cantidades de residuos celulósicos. La sacarificación de la celulosa por hidrólisis ácida produce hexosas y pentosas que pueden usarse en reacciones de fermentación. Sin embargo, el hidrolizado o licor de sulfito contiene altas concentraciones de sulfito e inhibidores fenólicos presentes de forma natural en la madera, que inhiben o evitan el crecimiento de la mayoría de organismos. Los siguientes ejemplos describen la fermentación de pentosa en hidrolizados ácidos (o licor residual de sulfito) de maderas duras y maderas blandas por las células de levadura de la presente invención. Se espera razonablemente que cepas de levadura que puedan crecer en licor residual de sulfito se espera que pudieran crecer en casi cualquier otro hidrolizado de biomasa.

Propagación

La invención se refiere además a un proceso de propagación aeróbica de la levadura consumidora de acetato, en particular propagación aeróbica de la cepa de levadura alteradora.

La propagación en este documento es cualquier proceso de crecimiento de levaduras que dé lugar a un aumento de una población inicial de levaduras. El propósito principal de la propagación es aumentar una población de levaduras usando las capacidades de reproducción naturales de la levadura como organismos vivos. Puede haber otras razones para la propagación, por ejemplo, en caso de que se use levadura seca, la propagación se usa para rehidratar y acondicionar la levadura, antes de su crecimiento. Pueden añadirse levaduras frescas, ya sean levaduras deshidratadas activas o torta húmeda para iniciar la propagación directamente.

Las condiciones de propagación son cruciales para la producción de levaduras óptimas y la posterior fermentación, tal como, por ejemplo, fermentación de hidrolizado lignocelulósico en etanol. Incluyen fuente de carbono adecuada, aireación, temperatura y adiciones de nutrientes. El tamaño del depósito para la propagación es normalmente entre un 2 por ciento y un 5 por ciento del tamaño del fermentador (hidrolizado lignocelulósico a etanol).

En la propagación, la levadura necesita una fuente de carbono. La fuente de carbono puede comprender en este documento glicerol y/o acetato y/o glúcidos (glúcidos C6 y C5). También pueden usarse otras fuentes de carbón. La fuente de carbono es necesaria para la biosíntesis de la pared celular y la producción de proteínas y energía.

La propagación es un proceso aeróbico, por tanto, el depósito de propagación debe airearse apropiadamente para mantener un determinado nivel de oxígeno disuelto. La aireación adecuada se consigue habitualmente mediante inductores de aire instalados en el conducto que va al depósito de propagación que empuja aire al interior de la mezcla de propagación según se llena el tanque y durante la recirculación. La capacidad de la mezcla de propagación de retener el oxígeno disuelto es una función de la cantidad de aire añadido y la consistencia de la mezcla, que es por lo que a menudo se añade agua a una relación entre 50:50 a 90:10 de puré a agua. Las mezclas de propagación "espesas" (relación de puré a agua de 80:20 y mayor) a menudo requieren la adición de aire comprimido para compensar la capacidad reducida de retener oxígeno disuelto. La cantidad de oxígeno disuelto en la mezcla de propagación a menudo es una función del tamaño de burbujas, de modo que algunas plantas de etanol añaden aire a través de rociadores que producen burbujas más pequeñas en comparación con los inductores de aire. Junto con la glucosa reducida, la aireación adecuada es importante para promover la respiración aeróbica, que difiere del entorno comparablemente anaeróbico de fermentación. Un signo de aireación inadecuada o altas concentraciones de glucosa es una producción aumentada de etanol en el depósito de propagación.

En general, durante la propagación, la levadura requiere una temperatura agradable para su crecimiento y metabolismo, por ejemplo, la temperatura en el reactor de propagación es entre 25-40 grados Celsius. En general, temperaturas inferiores provocan un metabolismo más lento y reproducción reducida, mientras que temperaturas mayores pueden causar producción de compuestos de sobrecarga y reproducción reducida. En una realización, los depósitos de propagación son interiores y están protegidos de la agresión de las altas temperaturas veraniegas o bajas temperaturas invernales, de modo que mantener las temperaturas óptimas dentro del intervalo de 30-35 °C habitualmente no es un problema.

Puede realizarse propagación adicional igual que se realiza normalmente la propagación de levaduras.

Fermentación

La célula de levadura de acuerdo con la invención es una célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa que tiene capacidad de consumo simultáneo anaeróbico de pentosa y glucosa. Además, la invención se refiere a un proceso para la fermentación de una célula de levadura de acuerdo con la invención, en el que el tiempo de fermentación para la fermentación sustancialmente completa de acetato, pentosa y hexosa se reduce con respecto a la fermentación correspondiente de la levadura de tipo silvestre. En una realización, el tiempo de fermentación se reduce un 40 % o más. En un proceso de fermentación preferido, se cofermenta pentosa y glucosa. En una realización del proceso, la tasa de producción global de etanol es al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 50 % o aproximadamente un 100 % mayor que la de un proceso con la correspondiente levadura de tipo silvestre. En una realización del proceso, el material que contiene pentosa comprende un hidrolizado de material lignocelulósico. El hidrolizado puede ser un hidrolizado enzimático de material lignocelulósico.

El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aeróbico o anaeróbico. Un proceso de fermentación anaeróbico en este documento se define como un proceso de fermentación que discurre en ausencia de oxígeno o en el que no se consume sustancialmente nada de oxígeno, preferiblemente menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 1 mmol/l/h, más preferiblemente se consume 0 mmol/l/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable) y en el que las moléculas orgánicas sirven tanto como donadoras de electrones como aceptadores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en glucólisis y formación de biomasa no puede oxidarse por fosforilación oxidativa. Para resolver este problema muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como aceptador de electrones e hidrógeno regenerando de ese modo NAD^+.

Por tanto, en un proceso de fermentación anaeróbico preferido se usa piruvato como electrón (y aceptador de hidrógeno) y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, butanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido y etileno.

El proceso de fermentación se ejecuta preferiblemente a una temperatura que es óptima para la célula. Por tanto, para la mayoría de levaduras o células hospedadoras fúngicas, el proceso de fermentación se realiza a una temperatura que es de menos de aproximadamente 42 °C, preferiblemente menos de aproximadamente 38 °C. Para células hospedadoras de levadura u hongo filamentoso, el proceso de fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura que es inferior a aproximadamente 35, aproximadamente 33, aproximadamente 30 o aproximadamente 28 °C y a una temperatura que es mayor de aproximadamente 20, aproximadamente 22 o aproximadamente 25 °C.

El rendimiento de etanol sobre xilosa y/o glucosa en el proceso preferiblemente es de al menos aproximadamente un 50, aproximadamente un 60, aproximadamente un 70, aproximadamente un 80, aproximadamente un 90, aproximadamente un 95 o aproximadamente un 98 %. El rendimiento de etanol se define en este documento como un porcentaje del rendimiento máximo teórico.

La invención también se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación.

El proceso de fermentación de acuerdo con la presente invención puede ejecutarse en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. En una realización, el proceso se realiza en condiciones microaerófilas o de oxígeno limitado.

Un proceso de fermentación anaeróbico en este documento se define como un proceso de fermentación ejecutado en ausencia de oxígeno o en que no se consume sustancialmente nada de oxígeno, preferiblemente menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 1 mmol/l/h, y en el que las moléculas orgánicas sirven tanto como donadoras de electrones como aceptadoras de electrones.

Un proceso de fermentación de oxígeno limitado es un proceso en que el consumo de oxígeno se limita mediante la transferencia de oxígeno del gas al líquido. El grado de limitación de oxígeno se determina por la cantidad de composición del flujo de gas entrante, así como las propiedades reales de mezcla/transferencia de masa del equipo de fermentación usado. Preferiblemente, en un proceso en condiciones de oxígeno limitado, la tasa de consumo de oxígeno es de al menos aproximadamente 5,5, más preferiblemente de al menos aproximadamente 6, tal como de al menos 7 mmol/l/h. Un proceso de la invención puede comprender la recuperación del producto de fermentación.

En un proceso preferido, la célula fermenta tanto la xilosa como la glucosa, preferiblemente simultáneamente, en cuyo caso se usa preferiblemente una célula que es insensible a la represión por glucosa para evitar el crecimiento diaúxico. Además de una fuente de xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el ingrediente apropiado requerido para el crecimiento de la célula. Las composiciones de

medios de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras son bien conocidas en la técnica.

Los procesos de fermentación pueden realizarse en modo discontinuo, semidiscontinuo o continuo. También puede aplicarse un proceso de hidrólisis y fermentación separado (SHF) o un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF). Una combinación de estos modos de proceso de fermentación también es posible para una productividad óptima. Estos procesos se describen posteriormente en este documento en mayor detalle.

Modo SSF

Para el modo simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF), el tiempo de reacción para la etapa de licuación/hidrólisis o presacarificación depende del tiempo para lograr un rendimiento deseado, es decir, rendimiento de conversión de celulosa en glucosa. Dicho rendimiento es preferiblemente lo más alto posible, preferiblemente de un 60 % a o más, un 65 % o más, un 70 % o más, un 75 % o más, un 80 % o más, un 85 % o más, un 90 % o más, un 95 % o más, un 96 % o más, un 97 % o más, un 98 % o más, un 99 % o más, incluso un 99,5 % o más o un 99,9 % o más.

De acuerdo con la invención, se logran concentraciones muy altas de glúcido en modo SHF y concentraciones de producto muy altas (por ejemplo, etanol) en modo SSF. En la función SHF la concentración de glucosa es 25 g/l o más, 30 g/l o más, 35 g/l o más, 40 g/l o más, 45 g/l o más, 50 g/l o más, 55 g/l o más, 60 g/l o más, 65 g/l o más, 70 g/l o más, 75 g/l o más, 80 g/l o más, 85 g/l o más, 90 g/l o más, 95 g/l o más, 100 g/l o más, 110 g/l o más, 120 g/l o más o puede ser, por ejemplo, 25 g/l-250 g/l, 30 g/l-200 g/l, 40 g/l-200 g/l, 50 g/l-200 g/l, 60 g/l-200 g/l, 70 g/l-200 g/l, 80 g/l-200 g/l, 90 g/l-200 g/l.

Concentración de producto en modo SSF

En la función SSF, la concentración de producto (g/l) depende de la cantidad de glucosa producida, pero esta no es visible ya que los glúcidos se convierten en producto en SSF, y las concentraciones de producto pueden estar relacionadas con la concentración de glucosa subyacente por multiplicación con el rendimiento máximo teórico (Yps máx. en gramo de producto por gramo de glucosa).

El rendimiento máximo teórico (Yps máx. en gramos de productos por gramo de glucosa) de un producto de fermentación puede obtenerse de libros de texto de bioquímica. Para etanol, 1 mol de glucosa (180 g) produce de acuerdo con la ruta de fermentación de glucólisis normal en levadura 2 moles de etanol (=2x46 = 92 g de etanol). El rendimiento máximo teórico de etanol sobre glucosa es, por lo tanto, 92/180 = 0,511 g de etanol/g de glucosa.

Para butanol (PM 74 g/mol) o isobutanol, el rendimiento máximo teórico es 1 mol de butanol por mol de glucosa. De modo que Yps máx. para (iso)butanol = 74/180 = 0,411 g de (iso)butanol/g de glucosa.

Para ácido láctico, el rendimiento de fermentación para fermentación homoláctica es 2 moles de ácido láctico (PM = 90 g/mol) por mol de glucosa. De acuerdo con esta estequiometría, el Yps máx. = 1 g de ácido láctico/g de glucosa.

Para otros productos de fermentación, puede hacerse un cálculo similar.

Modo SSF

En la función SSF, la concentración de producto es 25 g * Yps g/l/l o más, 30 * Yps g/l o más, 35 g * Yps /L o más, 40 * Yps g/l o más, 45 * Yps g/l o más, 50 * Yps g/l o más, 55 * Yps g/l o más, 60 * Yps g/l o más, 65 * Yps g/l o más, 70 * Yps g/l o más, 75 * Yps g/l o más, 80 * Yps g/l o más, 85 * Yps g/l o más, 90 * Yps g/l o más, 95 * Yps g/l o más, 100 * Yps g/l o más, 110 * Yps g/l o más, 120 g/L * Yps o más o puede ser, por ejemplo, 25 * Yps g/l-250 * Yps g/l, 30 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 40 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 50 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 60 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 70 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 80 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 90 * Yps g/l , 80 * Yps g/l-200 * Yps g/l.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para la preparación de un producto de fermentación, que es un método que comprende:

a. degradar lignocelulosa usando un método como se describe en este documento; y
b. fermentar el material resultante,

para preparar de ese modo un producto de fermentación.

Producto de fermentación

El producto de fermentación de la invención puede ser cualquier producto útil. En una realización, es un producto seleccionado del grupo que consiste en etanol, n-butanol, isobutanol, ácido láctico, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ácido itacónico, ácido maleico, ácido cítrico,

ácido adípico, un aminoácido tal como lisina, metionina, triptófano, treonina y ácido aspártico, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, un antibiótico de β-lactama y una cefalosporina, vitaminas, productos farmacéuticos, complementos de pienso para animales, productos químicos especializados, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles incluyendo biocombustibles y biogás o polímeros orgánicos y una enzima industrial tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, una liasa, una oxidorreductasa, una transferasa o una xilanasa.

Recuperación del producto de fermentación

Para la recuperación del producto de fermentación se usan tecnologías existentes. Para diferentes productos de fermentación son apropiados diferentes procesos de recuperación. Los métodos existentes de recuperación de etanol de mezclas acuosas habitualmente usan técnicas de fraccionamiento y adsorción. Por ejemplo, un alambique de cerveza puede usarse para procesar un producto fermentado, que contiene etanol en una mezcla acuosa, para producir una mezcla que contiene etanol enriquecida que después se somete o fraccionamiento (por ejemplo, destilación fraccionada u otras técnicas similares). A continuación, las fracciones que contienen las máximas concentraciones de etanol pueden pasarse a través de un adsorbente para eliminar la mayoría, si no toda, el agua restante del etanol.

Los siguientes ejemplos no limitantes están destinados a ser simplemente ilustrativos.

Ejemplos

Descripción de modelo matemático

Descripción de modelo matemático

Se desarrolló una descripción de modelo matemático de cepa de levadura fermentadora de xilosa y conversora de acetato de glicerol de acuerdo con una estrategia de modelo mínimo. Se muestra un esquema de las rutas agrupadas incluidas en el modelo en la figura 1. Se modelan las siguientes rutas: 1.) captación y metabolismo de glucosa (glucólisis superior), 2.) captación y metabolismo de xilosa, 3.) captación y metabolismo de glicerol, 4.) formación de etanol (glucólisis inferior), 5.) captación y metabolismo de acetato, 6.) formación de biomasa, 7.) recambio de ATP para mantenimiento, 8.) producción de CO2 y etanol.

Las ecuaciones matemáticas usadas para modelar las tasas específicas de biomasa son:

$$captación\ de\ glucosa\ (g/gDW/hora) = Vmáx \times \frac{[glucosa]}{[glucosa] + KmGLC} \times \frac{[ATP]}{[ATP] + KmATP} \times \frac{1}{1 + \frac{[Cmol]}{KiCmol}}$$

captación de xilosa (g/gDW/hora)

$$= Vmáx \times \frac{[xilosa]}{[xilosa] + KmXYL \times \frac{[glucosa]}{KiGLC}} \times \frac{[ATP]}{[ATP] + KmATP} \times \frac{1}{1 + \frac{[Cmol]}{KiCmol}}$$

captación de glicerol (g/gDW/hora)

$$= Vmáx \times \frac{[glicerol]}{[glicerol] + KmGLY} \times \frac{[ATP]}{[ATP + KmATP} \times \frac{[NAD]}{[NAD] + KmNAD} \times \frac{1}{1 + \frac{[glucosa]}{KiGLC}}$$

captación de acetato (g/gDW/hora)

$$= Vmáx \times \frac{[acetato]}{[acetato] + KmACE} \times \frac{[ATP]}{[ATP] + KmATP} \times \frac{[NADH]}{[NAD] + KmNADH}$$

$$formación\ de\ etanol\ (g/gDW/hora = Vmáx \times \frac{[Cmol]^{nH}}{[Cmol]^{nH} + KmCmol^{nH}} \times \frac{[ADP]}{[ADP] + KmADP}$$

$$formación\ de\ biomasa\ (g/gDW/hora = Vmáx \times \frac{[Cmol]}{[Cmol] + KmCmol} \times \frac{[ATP]^{nH}}{[ATP]^{nH} + KmATP^{nH}}$$

ATP de mantenimiento (mol/gDW/hora)

$$= k1 \times \frac{[ATP] - ATP_{LB}}{([ATP] - ATP_{LB}) + KmATP} \times \left(1 + k2 \times \frac{[acetato]^{nH}}{[acetato]^{nH} + KmACE^{nH}}\right)$$

la pérdida de CO2 se calculó a partir de la tasa de formación de etanol basándose en una relación 1:1 *mol:mol*

La conversión unitaria de g a Cmol se realizó usando los factores de conversión enumerados en la tabla 11. El coste de ATP de formación de biomasa se estableció a 0,00675 moles de ATP/gDW. La generación de NADH por síntesis de biomasa se estableció a 3e-3 mol/gDW.

Tabla 11, conversión de unidad de gramo a Cmol

Metabolito	***Peso molecular (g/mol)***	***Cmol/mol***	***Cmol/g***
glucosa	180	6	0,033
xilosa	150	5	0,033
glicerol	92	3	0,033
acetato	60	2	0,033
etanol	46	2	0,043
biomasa	--	--	0,037

Se estimaron los valores de los parámetros minimizando el error entre las predicciones del modelo y los datos del transcurso del tiempo de concentraciones de glúcidos, etanol, glicerol y acetato. Los valores de los parámetros y las condiciones iniciales se enumeran en la tabla 12 y la tabla 13, respectivamente.

El modelo se implementó usando MATLAB versión R2012A (Mathworks) y las ecuaciones diferenciales habituales se resolvieron usando un solucionador de ODE numérico: ODE15s.

Tabla 12, valores de los parámetros usados en el modelo matemático

Captación de glucosa	
Vmáx	0,975 (g/gDW/hora)
KmGLC	0,5 (g/l)
KmATP	1e-8 (mol/gDW)
KiCmol	5e-6 (Cmol/gDW)
Captación de xilosa	
Vmáx	0,672 (g/gDW/hora)
KmXYL	5 (g/l)
KiGLC	10 (g/l)
KmATP	1e-8 (mol/gDW)
KiCmol	5e-6 (Cmol/gDW)
Captación de glicerol	
Vmáx	0,3 (g/gDW/hora)
KmGLY	1 (g/L)
KmATP	1e-7 (mol/gDW)
KmNAD	1e-7 (mol/gDW)
KiGLC	1e3 (g/l)
Captación de acetato	
Vmáx	0,09 (g/gDW/hora)
KmACE	2 (g/l)
KmATP	1e-8 (mol/gDW)
KmNADH	1e-7 (mol/gDW)
Formación de etanol	
Vmáx	20 (g/gDW/hora)
KmCmol	1e-5 (Cmol/gDW)
nH	2 (sin unidad)
KmADP	1e-8 (mol/gDW)
Formación de biomasa	
Vmáx	2 g/gDW/hora
KmCmol	1e-5 (Cmol/gDW)
KmATP	1e-6 (mol/gDW)
nH	1 (sin unidad)
ATP de mantenimiento	
k1	6e-3 (mol/gDW/hora)
ATP_{LB}	1e-8 (mol/gDW)
KmATP	1e-8 (mol/gDW)
k2	14 (sin unidad)
nH	2 (sin unidad)
KmACE	15 (g/l)

Tabla 131, caldo de fermentación típico en condiciones iniciales

Variable de estado	***Condición inicial***
[glucosa]	42,3 (g/l)
[xilosa]	29,0 (g/l)
[acetato]	3,6 (g/l)
[glicerol]	10,6 (g/l)
[etanol]	0,5 (g/l)
[biomasa]	1,24 (gDW/l)
[Cmol] intracelular	5e-9 (Cmol/gDW)
[ATP][#] intracelular	5e-7 (mol/gDW)
[NADH][*] intracelular	0 (mol/gDW)
Volumen del fermentador	1 (l)

[#] La [ADP] intracelular se calculó de acuerdo con la relación: [ADP] (mol/gDW) = 1e-6 - ATP
[*] La [NAD] intracelular se calculó de acuerdo con la relación: [NAD] (mol/gDW) = 1e-6 - [NADH]

Materiales y métodos

Técnicas generales de biología molecular

Salvo que se indique de otro modo los métodos usados son técnicas bioquímicas convencionales. Ejemplos de libros de texto generales de metodología adecuados incluyen Sambrook *et al.* [1] y Ausubel *et al.* [2].

Medios

Se usó medio YEPhD líquido (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de fitona y 20 g/l de glucosa) para la propagación y selección de transformantes. Para obtener medio sólido, se añadió 15 g/l de agar al medio líquido antes de la esterilización. Se añadió fleomicina a una concentración final de 60 µg/ml para la selección del marcador zeoMX.

Se usó medio GAST como medio anterior al cultivo antes del experimento de crecimiento (la composición se muestra en la tabla 9). Durante el experimento de crecimiento anaeróbico se usó medio mineral como se describe por Verduyn *et al* [3], complementado con histidina (200 mg/l), urea (2,325 g/l), ergosterol (0,01 g/l) y Tween80 (0,42 g/l). Se añadieron glúcidos, glicerol y ácido acético como se indica.

Tabla 14. Composición del medio GAST

Medio completo	***g/kg***	***1***	***0,25***
MES hidrato	20	20	5
K2HPO4	2	2	0,5
NaH2PO4.1 ac.	1	1	0,25
Extracto de levadura	1	1	0,25
Sulfato de amonio	7,5	7,5	1,875
Solución de oligoelementos TE-SF	2	2	0,5
Solución madre de vitamina Ca Mg 100x FS	10	10	2,5
pH con KOH 4 normal hasta pH 6			
Almidón (Zulkowsky)	30	30	7,5
Preparar en kg		1	

Se disuelven todos los componentes excepto el almidón, se ajusta el pH, se añade el almidón y se esteriliza en filtro
Se añadió glucoamilasa (20-50 µl/l) justo antes de empezar el experimento
La solución madre de glucoamilasa (HAS GLA para CGR contiene 5000 GA/ml

Se usó hidrolizado de rastrojo de maíz pretratado como medio de fermentación (la composición se muestra en la tabla 10). Los sólidos suspendidos en los hidrolizados se retiraron por centrifugación a 4520xg durante 30 min, seguida de filtración (106 µm) del sobrenadante antes de la fermentación. El pH del medio se ajustó hasta 5,5 usando amoniaco, que también funcionó como fuente de nitrógeno durante el crecimiento. Se añadió tanto neomicina (50 ug/ml) como penicilina-G (100 ug/ml) para evitar contaminaciones bacterianas durante la fermentación. Se añadió histidina (200 mg/ml) para complementar la auxotrofia de las levaduras y se añadió antiespumante de silicona para evitar la formación de espuma en los matraces de fermentación.

Tabla 15. Composición de hidrolizado de pCS

Compuesto	**Hidrolizado de pCS (compuestos g/l)**
Monómeros de glúcido:	
Glucosa	64,5
Xilosa	33,6
Arabinosa	4,1
Inhibidores y subproductos:	

Compuesto	Hidrolizado de pCS (compuestos g/l)
Monómeros de glúcido:	
Ácido acético	5,1
Ácido láctico	ND
Ácido Fórmico	0,2
Glicerol	0,4
Etanol	ND
Hidroximetilfurfural (HMF)	0,4
Furfural	0,7
Otros análisis:	
pH	4,5
Materia seca	19,5 %
Densidad	1,05 g/ml

Cepas

La tabla 16 proporciona un resumen de las cepas que se usaron en estos experimentos. RN1069 es una cepa de referencia. Es una cepa conversora de glucosa, xilosa que carece de la capacidad de consumir glicerol y ácido acético en condiciones anaeróbicas. YD01247 y YD01248 se han construido introduciendo los genes de la ruta de glicerol y ácido acético en RN1069, como se describe en el documento WO 2015028583 y el documento WO 2015028582. De estas solicitudes de patente, está claro que los genes introducidos difieren entre las dos cepas. YD01247 contiene el gen *adhE* bifuncional de *E. coli* y el gen *DAK1* de *Y. lypolitica,* mientras que YD01248 contiene el gen *acdH* de *L. plantarum* y una sobreexpresión de *DAK1* de *S. cerevisiae.*

Tabla 16. Cepas usadas y su fondo genético

Cepa	*Fondo*
RN1069	*HIS3*::loxP, *GPD1*::hphMX, *GPD2*::natMX. Sobreexpresión de *xylA, XKS1, TAL1, TKL1, RPE1* y *RKI1*
YD01247	RN1069 (INT1::pTDH3Ec.*adhE*-pENO1Ec.*gldA*-pPRE3*ACS2*-pTPI1Ylip.*DAK1*-G418R)
YD01248	RN1069 (INT1::pTDH3Lpla.*acdH*-pENO1Ec.*gldA*-pPGK1*ACS2*-pTPI1*DAK1*-G418R)

Construcciones de integración y selección de las mismas

La eliminación de *ALD6* se consiguió usando recombinación homóloga basada en construcciones mostradas en la figura 2. La figura 2 muestra un resumen esquemático de la estrategia: eliminación de ALD6 usando el marcador zeoMX. Estas modificaciones se introdujeron en YD01247, YD01248.

Se usó el marcador zeoMX para la selección.

Después de la transformación, se verificó la integración correcta por PCR. Se recogieron varios transformantes independientes. El transformante a ensayar en AFM se seleccionó basándose en el comportamiento en un experimento de crecimiento anaeróbico.

Experimento de crecimiento

Antes del experimento de crecimiento, los transformantes y las cepas de referencia se cultivaron durante una noche a 30 °C en una placa de pocillos de agar YEPhD. Las cepas de referencia se sembraron en cinco réplicas en la placa de pocillos de agar, mientras que los transformantes independientes se sembraron en una réplica.

Se inocularon precultivos de medio GAST líquido de la placa de pocillos de agar en formato MTP de 96 pocillos usando una herramienta puntas. Las placas de precultivo se incubaron en condicione aerobias a 30 °C, 250 r.p.m. y 80 % de humedad en una estufa de incubación Infors durante 72 horas.

Usando una unidad de inoculación robótica, se inocularon 5 µl de precultivo en las placas de cultivo principales. Se usaron los siguientes medios de crecimiento en las placas de cultivo principales, 270 µl en cada pocillo:

- Verduyn + glucosa al 2 %, xilosa al 2 %, 2 g/l de HAc, pH 4,5
- Verduyn + glucosa al 2 %, xilosa al 2 %, glicerol al 1 %, 2 g/l de HAc, pH 4,5

Se preparó una placa para cada medio y cada punto de muestra (24, 48 y 72 horas), produciendo seis placas de cultivo principales en total.

Las placas de cultivo principales se incubaron en una estufa de incubación de agitación Infors a 30 °C, 250 r.p.m., 80 % de humedad, la estufa de incubación se purgó con nitrógeno para obtener (y retener) condiciones anaeróbicas. Las placas de cultivo principales se centrifugaron después de 24, 48 y 72 horas. Se añadieron 150 µl de

sobrenadante a una placa de 96 pocillos profundos que contenía 400 µl de D_2O en cada pocillo. También se añadieron 100 µl de patrón de RMN (20 g/l de ácido maleico) a cada muestra. Para cada muestra, se determinaron las concentraciones de glúcidos residuales, glicerol, ácido acético y etanol usando análisis de RMN.

Análisis de RMN

Para la cuantificación de glucosa, xilosa, glicerol, ácido acético y etanol en la muestra, se transfirieron 100 µl de muestra de forma precisa a un vial adecuado. Posteriormente, se añadieron 100 µl de solución de patrón interno, que contenía ácido maleico (20 g/l), EDTA (40 g/l) y cantidades mínimas de DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico) en D_2O, y 450 µL de D_2O.

Se registraron los espectros de RMN de ^1H 1D en un Bruker Avance III 700 MHz, equipado con una criosonda, usando un programa de impulsos con supresión de agua (potencia correspondiente a 3 Hz) a una temperatura de 27 °C.

Se calcularon las concentraciones de analito basándose en las siguientes señales (δ con respecto a DSS):

- pico de α-glucosa a 5,22 ppm (d, 0,38 H, J = 4 Hz),
- pico de α-xilosa a 5,18 ppm (d, 0,37 H, J = 4 Hz),
- pico de glicerol a 3,55 ppm (dd, 2 H, $J_{1,2}$ = 6 Hz y $J_{1a,1b}$ = 12 Hz)
- pico de ácido acético a 1,91 ppm (s, 3 H)
- pico de etanol a 1,17 ppm (t, 3 H, J = 7Hz)

La señal usada para el patrón:

- pico de ácido maleico a 6,05 ppm (s, 2H)

Cultivo de levadura para experimento de AFM

Las cepas, véase la tabla 5, se sembraron en estrías en placas de agar YEPhD a partir de las soluciones madre de glicerol correspondientes y las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas. Se inocularon 200 ml de medio mineral usando una estría de células de las placas de agar YEPhD. Estos precultivos se incubaron durante una noche en una estufa de incubación de agitación a 32 °C a 200 r.p.m. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con ddH_2O. Los sedimentos celulares entonces se suspendieron en ddH_2O, usando aproximadamente 1/3 del volumen de cultivo. El volumen del inoculo para la fermentación se calculó usando el valor de DO 700 de las suspensiones de levaduras y una correlación lineal determinada previamente entre DO 700 y la biomasa de levadura.

Se usaron las siguientes cepas durante el experimento de AFM:

1. YD01248 (referencia)
2. YD01248 (ald6::loxPzeoMXloxP) col. n.º 7
3. YD01247 (referencia)
4. YD01247 (ald6::loxPzeoMXloxP) col. n.º 2

Condiciones de AFM

Los matraces de fermentación de 500 ml se llenaron con 400 ml de hidrolizado y se inocularon a una concentración de biomasa de levadura de 0,5 g/l. El medio de fermentación se mantuvo a 32 °C y se agito a 250 r.p.m., el pH no se controló durante la fermentación. Además del registro en línea de la producción de CO_2 por AFM (correlación con la formación de etanol (EtOH) y biomasa), las muestras se tomaron con una frecuencia de intervalo de 6 horas durante la fermentación para controlar el crecimiento de las levaduras, utilización de sustrato, y la formación de producto. El tiempo de fermentación total fue 72 horas.

Ejemplo 1

Efecto modelador del ATP de mantenimiento decreciente sobre las tasas de conversión de glucosa y xilosa

Se realizaron simulaciones con el modelo matemático para identificar las oportunidades de mejorar las tasas de conversión de glucosa y xilosa de cepas de levadura conversoras de glicerol y acetato. Las simulaciones indicaron que la alta demanda de ATP de mantenimiento de las células retarda las conversiones de xilosa y glucosa en etanol (véase la figura 3). La figura 3 muestra las predicciones del comportamiento de fermentación para una demanda de ATP de mantenimiento de referencia (líneas negras), una demanda de ATP de mantenimiento disminuida en un 10 % (líneas grises punteadas) y una demanda de ATP de mantenimiento disminuida en un 50 % (líneas negras discontinuas). La disminución de un 10 % y un 50 % en el ATP de mantenimiento se implementó estableciendo el parámetro de modelo *k1* (véase la tabla 2) a 5,4e-3 y 3e-3 (mol/gDW/hora), respectivamente. Estos resultados

muestran claramente que disminuir la demanda de ATP de mantenimiento aumenta la tasa de conversión de glúcido en etanol. Incluso una disminución pequeña en el ATP de mantenimiento (-10 %) ya tiene un efecto significativo.

Ejemplo 2

Identificación del ciclo fútil de alteración como diana para una demanda de ATP de mantenimiento disminuida

El modelo matemático predijo que disminuir la demanda de ATP de mantenimiento aumentará las tasas de conversión de glúcido en etanol (véase el ejemplo 1). Una posible fuente de recambio de ATP de mantenimiento es el ciclo fútil. Para posibilitar la conversión de acetato en etanol se introdujo una acetaldehído deshidrogenasa acetilante (por ejemplo, *adhE* o *acdH*) en las cepas (véanse los documentos WO 2015028583 y WO 2015028583). Esto también introdujo un posible ciclo fútil en las cepas, véase la figura 4.

La figura 3 muestra un resumen esquemático de las rutas metabólicas implicadas en el ciclo fútil de acetaldehído-acetato-acetil-CoA, que causa un ATP de mantenimiento aumentado. El ciclo fútil se indica por flechas discontinuas. La acetaldehído deshidrogenasa acetilante (adhE, acdH) se introdujo en la cepa para posibilitar la conversión de acetato en etanol.

Se espera que la alteración del ciclo fútil disminuya el ATP de mantenimiento y de ese modo mejore la conversión de glucosa y xilosa en etanol (ejemplo 1). La diana para la alteración del ciclo fútil es la enzima que cataliza la conversión de acetaldehído en acetato en el citoplasma (ALD6). La ACS o acetaldehído deshidrogenasa acetilante no puede ser una diana para la alteración del ciclo fútil porque estas enzimas son parte de la ruta de conversión de acetato en etanol.

Ejemplo 3

Ensayo de AFM de cepa de supresión de ALD6

Para verificar de forma experimental las predicciones del modelo de que la eliminación de ALD6 aumenta las tasas de conversión de glúcido en etanol, se ensayaron las siguientes cepas en AFM:

1. YD01248 (referencia)
2. YD01248 (ald6::loxPzeoMXloxP) col. n.º 7, en este documento *"YD01248 ΔALD6"*.
3. YD01247 (referencia)
4. YD01247 (ald6::loxPzeoMXloxP) col. n.º 2, en este documento *"YD01247 ΔALD6"*

Cada 6 horas, se tomaron muestras para el análisis por HPLC, para determinar la concentración de glúcido residual y la formación de etanol. Los resultados se presentan en la figura 5. La figura 5 muestra una comparación de las tasas de consumo de glúcido y formación de etanol entre las cepas de referencia (YD01248, YD01247; líneas transparentes) y las cepas de eliminación de ALD6 (YD01248 ΔALD6, YD01247 ΔALD6; líneas rellenas).

La tabla 12 resume los rendimientos de etanol sobre glúcidos totales para las cepas de referencia frente a las cepas de eliminación de ALD6 a las 48 horas y 72 horas. La figura 5 y la tabla 7 indican que en ambas cepas de referencia la eliminación de ALD6 provocaba tasas aumentadas de conversión de glúcido en etanol. Estos resultados confirman las predicciones del modelo y demuestran el efecto positivo de la eliminación de ALD6 sobre la conversión de glúcido en etanol en cepas de levadura conversoras de glicerol-acetato.

Tabla 12. Rendimiento de etanol sobre glúcidos totales a las 48 y 72 horas. Los glúcidos totales se definieron como: glucosa +xilosa + arabinosa en el momento que es 0 horas.

	Rendimiento de etanol sobre glúcidos totales a las 48 horas (g/g)	***Rendimiento de etanol sobre glúcidos totales a las 72 horas (g/g)***
YD01247	0,25	0,41
YD01247 ΔALD6	0,38	0,44
YD01248	0,25	0,43
YD01248 ΔALD6	0,33	0,47

Ejemplo 4

Ensayo de AFM de cepa de supresión de ALD6 en ausencia de una ruta anaeróbica de fermentación de glicerol (gldA, DAK1)

Para verificar experimentalmente los beneficios de la eliminación del *ALD6* en cepas que no contienen la ruta anaeróbica de fermentación de glicerol (gldA, DAK1), se construyeron las siguientes cepas:

Tabla 13

Cepa	Genotipo	Abreviatura
RN1069 + pRN595	RN1069, pRN595	Referencia
RN1069-Δald6 + pRN595, n.º 20-1	RN1069; ald6::loxP-kanMx-loxP, pRN595, colonia 20-1	*ΔALD6* n.º 20-1
RN1069-Δald6 + pRN595, n.º 20-2	RN1069; ald6::loxP-kanMx-loxP, pRN595, colonia 20-2	*ΔALD6* n.º 20-2

La tabla 13 proporciona un resumen de las cepas que se usaron en estos experimentos. La construcción de RN1069 se describe en el documento WO 2015028583. En resumen, RN1069 es una cepa de *S. cerevisiae* auxotrofa de histidina (eliminación de *his3*) con la ruta de fermentación de xilosa introducida y, adicionalmente, *gpd1* y *gpd2* eliminados. Por lo tanto, RN1069 no puede formar biomasa de forma anaeróbica ya que no puede mantenerse el equilibrio de oxidorreducción debido a la anulación de la ruta de formación de glicerol. RN1069 se transformó con pRN595. La construcción de pRN595 se describió en el documento US 2015176032. En resumen, pRN595 es un vector de expresión de levaduras de alto número de copias que alberga el origen de replicación de 2 µ, el marcador *HIS3* y la secuencia de codones optimizados de *adhE* de *E. coli* bajo el control del promotor de *PGK1* de S. cerevisiae. Los transformantes correctos se seleccionaron basándose en la selección en medio de agar complementado con 0,67 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Sigma-Aldrich) y glucosa al 2 % v/v sin histidina añadida. La introducción de *adhE* de *E. coli* en RN1069 permitió el crecimiento anaeróbico en presencia de ácido acético. Se seleccionó una colonia y se llamó RN1069 + pRN595, que sirvió como cepa de referencia.

La eliminación de *ALD6* se consiguió usando recombinación homóloga de forma similar a lo descrito anteriormente. La eliminación de *ALD6* se consiguió remplazando el ORF por el marcador kanMX. El marcador kanMX flanqueado por flox se amplificó por PCR a partir de plásmido pRN772 (SEQ ID NO: 1) usando los cebadores 12388 + 12389 (SEQ ID NO: 2 y 3 respectivamente), que contenían 50 pb homólogas a la secuencia 5' en dirección 5' de la secuencia codificante de ALD6 y 50 pb homólogas a la secuencia 3' en dirección 3' a la secuencia codificante ALD6 respectivamente. RN1069 + pRN595 se transformó con el fragmento de PCR resultante y los transformantes se seleccionaron basándose en la resistencia a G418. Después de la transformación, se verificó la integración correcta del marcador kanMX en el locus *ALD6* por PCR. Se recogieron dos transformantes independientes y se ensayó su comportamiento de fermentación en un experimento de fermentación de AFM.

Las fermentaciones se realizaron en medios sintéticos que imitaban las restricciones de glúcido y los niveles de acetato en hidrolizado de rastrojo de maíz pretratado. Los medios se basan en medio Verduyn convencional con urea como fuente de nitrógeno complementado con 60 g/l de glucosa y 35 g/l de xilosa y ácido acético. El ácido acético se complementó en dos concentraciones iniciales diferentes: es decir 3 g/l y 4 g/l. El pH de partida de todos los medios se estableció a pH=5,5. Los matraces de fermentación de 500 ml se llenaron con 400 ml de medio y se inocularon a una concentración de biomasa de levadura de 0,5 g/l. El medio de fermentación se mantuvo a 32 °C y se agitó a 250 r.p.m., el pH no se controló durante la fermentación. Además del registro en línea de la producción de CO_2 por AFM (correlación con la formación de etanol (EtOH) y biomasa), se tomaron muestras con una frecuencia de intervalo de 6 horas durante la fermentación para controlar el crecimiento de las levaduras, utilización de sustrato, y la formación de producto. El tiempo de fermentación fue de 72 horas.

Cada 6 horas, se recogieron muestras para el análisis por HPLC, para determinar la concentración de glúcido residual y la formación de etanol. Los resultados se presentan en la figura 6 y 7. La figura 6 y 7 muestran una comparación de las tasas de consumo de glúcido y formación de etanol entre las cepas de referencia y de eliminación de *ald6* para la concentración de ácido acético inicial de 3 y 4 g/l, respectivamente. La referencia se indica con líneas transparentes y las cepas de eliminación de ALD6 (Δ*ald6*) con líneas rellenas.

La tabla 14 resume los rendimientos de etanol sobre glúcidos totales para las cepas de referencia frente a las cepas de eliminación de ALD6 a las 48 horas y 72 horas. Las figuras 6, 7 y la tabla 14 indican que en ambas cepas de referencia la eliminación de *ald6* provocaba tasas aumentadas de conversión de glúcido en etanol.

Tabla 14: Rendimiento de etanol sobre glúcidos totales a las 48 y 72 horas. Los glúcidos totales se definieron como: glucosa + xilosa + arabinosa en el momento que es 0 horas

	Rendimiento de etanol sobre glúcidos totales a las 48 horas (g/g)	***Rendimiento de etanol sobre glúcidos totales a las 72 horas (g/g)***
Referencia, ácido acético *3 g*/l	0,11	0,21
Δald6 n.º 20-1, ácido acético *3 g*/l	0,33	0,43
Δald6 n.º 20-2, ácido acético *3 g*/l	0,34	0,44
Reference, ácido acético *4 g*/l	0,09	0,20
Δald6 n.º 20-1, ácido acético *4 g*/l	0,32	0,43
Δald6 n.º 20-2, ácido acético *4 g*/l	0,32	0,43

Estos resultados muestran que la eliminación de *ald6* también es beneficiosa en cepas sin una ruta anaeróbica de fermentación de glicerol (gldA, DAK1).

Referencias

1. Sambrook *et al.* (1989), "*Molecular Cloning, a laboratory manual*"
2. Ausubel *et al.* (1995), "*Current protocols in Molecular Biology*"
3. Verduyn *et al.* (1992) "*Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation*" Yeast 8: 501-517
4. Meaden *et al.* (1997), "*The ALD6 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a cytosolic, Mg(2+)-activated acetaldehyde dehydrogenase*", Yeast 13(14):1319-27
5. Saint-Prix *et al.* (2004), "*Functional analysis of the ALD gene family of Saccharomyces cerevisiae during anaerobic growth on glucose: the NADP+-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation*", Microbiology 150(Pt 7):2209-20

Lista de secuencias

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Célula de levadura que consume acetato

<130> 31210-WO-PCT

<150> EP15168833.0
<151> 22-05-2015

<160> 3

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1
<211> 5005
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<222> 1…5005
<223> /organismo="Secuencia artificial"/nota="pRN772 (plásmido que alberga la secuencia loxP-kanMX-loxP)" /mol_tipo="ADN no asignado"

<400> 1

gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 60
ctatgaccat gattacgcca agctatttag gtgacactat agaatactca agctatgcat 120
caagcttggt accgagctcg gatccactag cataacttcg tataatgtat gctatacgaa 180
gttattctag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc ttaagcttgc ctcgtccccg 240
ccgggtcacc cggccagcga catggaggcc cagaataccc tccttgacag tcttgacgtg 300
cgcagctcag gggcatgatg tgactgtcgc ccgtacattt agcccataca tccccatgta 360
taatcatttg catccataca ttttgatggc cgcacggcgc gaagcaaaaa ttacggctcc 420
tcgctgcaga cctgcgagca gggaaacgct cccctcacag acgcgttgaa ttgtccccac 480
gccgcgcccc tgtagagaaa tataaaaggt taggatttgc cactgaggtt cttctttcat 540
atacttcctt ttaaaatctt gctaggatac agttctcaca tcacatccga acataaacaa 600
ccatgggtaa ggaaaagact cacgtttcga ggccgcgatt aaattccaac atggatgctg 660
atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata atgtcgggca atcaggtgcg acaatctatc 720
gattgtatgg gaagcccgat gcgccagagt tgtttctgaa acatggcaaa ggtagcgttg 780
ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac taaactggct gacggaattt atgcctcttc 840
cgaccatcaa gcattttatc cgtactcctg atgatgcatg gttactcacc actgcgatcc 900
ccggcaaaac agcattccag gtattagaag aatatcctga ttcaggtgaa aatattgttg 960
atgcgctggc agtgttcctg cgccggttgc attcgattcc tgtttgtaat tgtcctttta 1020
acagcgatcg cgtatttcgt ctcgctcagg cgcaatcacg aatgaataac ggtttggttg 1080

atgcgagtga ttttgatgac gagcgtaatg gctggcctgt tgaacaagtc tggaaagaaa 1140
tgcataagct tttgccattc tcaccggatt cagtcgtcac tcatggtgat ttctcacttg 1200
ataaccttat ttttgacgag gggaaattaa taggttgtat tgatgttgga cgagtcggaa 1260
tcgcagaccg ataccaggat cttgccatcc tatggaactg cctcggtgag ttttctcctt 1320
cattacagaa acggcttttt caaaaatatg gtattgataa tcctgatatg aataaattgc 1380
agtttcattt gatgctcgat gagtttttct aatcagtact gacaataaaa agattcttgt 1440
tttcaagaac ttgtcatttg tatagttttt ttatattgta gttgttctat tttaatcaaa 1500
tgttagcgtg atttatattt tttttcgcct cgacatcatc tgcccagatg cgaagttaag 1560
tgcgcagaaa gtaatatcat gcgtcaatcg tatgtgaatg ctggtcgcta tactgctgtc 1620
gattcgatac taacgccgcc atccagtgtc gacgatatct agagcgcgca taacttcgta 1680
taatgtatgc tatacgaagt tataggatcc atcacactgg cggccgctcg agcatgcatc 1740
tagagggccc aattcgccct atagtgagtc gtattacaat tcactggccg tcgttttaca 1800
acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc 1860
tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg 1920
cagcctatac gtacggcagt ttaaggttta cacctataaa agagagagcc gttatcgtct 1980
gtttgtggat gtacagagtg atattattga cacgccgggg cgacggatgg tgatccccct 2040
ggccagtgca cgtctgctgt cagataaagt ctcccgtgaa ctttacccgg tggtgcatat 2100
cggggatgaa agctggcgca tgatgaccac cgatatggcc agtgtgccgg tctccgttat 2160
cggggaagaa gtggctgatc tcagccaccg cgaaaatgac atcaaaaacg ccattaacct 2220
gatgttctgg ggaatataaa tgtcaggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 2280
ccttttcacg tagaaagcca gtccgcagaa acggtgctga ccccggatga atgtcagcta 2340
ctgggctatc tggacaaggg aaaacgcaag cgcaaagaga aagcaggtag cttgcagtgg 2400
gcttacatgg cgatagctag actgggcggt tttatggaca gcaagcgaac cggaattgcc 2460
agctggggcg ccctctggta aggttgggaa gccctgcaaa gtaaactgga tggctttctc 2520
gccgccaagg atctgatggc gcaggggatc aagctctgat caagagacag gatgaggatc 2580
gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt gggtggagag 2640
gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg 2700
gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa 2760
tgaactgcaa gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggcg ttccttgcgc 2820
agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc 2880
ggggcaggat ctcctgtcat ctcaccttgc tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga 2940

tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa 3000
acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct 3060
ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgagcat 3120
gcccgacggc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt 3180
ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta 3240
tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga 3300
ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcatcg ccttctatcg 3360
ccttcttgac gagttcttct gaattattaa cgcttacaat ttcctgatgc ggtattttct 3420
ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catacaggtg gcacttttcg gggaaatgtg 3480
cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga 3540
caataaccct gataaatgct tcaataatag cacgtgagga gggccaccat ggccaagttg 3600
accagtgccg ttccggtgct caccgcgcgc gacgtcgccg gagcggtcga gttctggacc 3660
gaccggctcg ggttctcccg ggacttcgtg gaggacgact tcgccggtgt ggtccgggac 3720
gacgtgaccc tgttcatcag cgcggtccag gaccaggtgg tgccggacaa caccctggcc 3780
tgggtgtggg tgcgcggcct ggacgagctg tacgccgagt ggtcggaggt cgtgtccacg 3840
aacttccggg acgcctccgg gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc gtgggggcgg 3900
gagttcgccc tgcgcgaccc ggccggcaac tgcgtgcact tcgtggccga ggagcaggac 3960
tgacacgtgc taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ccttttttgat 4020
aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 4080
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 4140
acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 4200
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 4260
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 4320
atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 4380
agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag 4440
cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 4500
agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 4560
acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 4620
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 4680
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tgggcttttg ctggcctttt 4740
gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 4800
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc aagcgcccaa 4860
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt 4920
ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt 4980
aggcacccca ggctttacac tttat 5005

<210> 2
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<222> 1...70
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 12388 (ald6 flanco 5 directo)" /mol_tipo="ADN no asignado"

<400> 2
gcagaaaaga ggggcagtgg cctgtttttc gacataaatg aggggcatgg cgccaagcta 60

tttaggtgac 70

<210> 3
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<222> 1...70
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 12389 (ald6 flanco 3 inverso)" /mol_tipo="ADN no asignado"

<400> 3
tccacgttag ttttctttgg atatagcagt tgttgtacac tagcttaaga tcactatagg 60

gcgaattggg 70

REIVINDICACIONES

1. Una célula de levadura que está modificada genéticamente, que comprende:

a) una alteración de una o más aldehído deshidrogenadas (E.C:1.2.1.4) nativas de la levadura;
b) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una acetaldehído deshidrogenasa acetilante dependiente de NAD^+ (E.C. 1.2.1.10) heteróloga;
c) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una acetil-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.1) homóloga o heteróloga; y
d) una modificación que da lugar a la reducción de la actividad de glicerol 3-fosfato fosfohidrolasa (E.C. 3.1.3.21) y/o glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.8 o E.C. 1.1.5.3), nativa de la levadura.

2. La célula de levadura de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la una o más aldehído deshidrogenasas (E.C:1.2.1.4) nativas de la levadura en a) son acetaldehído deshidrogenasa-6 (ALD6).

3. La célula de levadura de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la célula de levadura comprende e) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una xilosa isomerasa (E.C.5.3.1.5) heteróloga.

4. La célula de levadura de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la célula de levadura comprende una alteración de uno o más de los genes gpp1, gpp2, gpd1 y gpd2 nativos de la levadura.

5. La célula de levadura de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la célula de levadura comprende además:

f) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una glicerol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.6) heteróloga; y
g) una o más secuencias nucleotídicas que codifican una dihidroxiacetona cinasa (E.C. 2.7.1.28 o E.C. 2.7.1.29) homóloga o heteróloga.

6. La célula de levadura de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la célula de levadura es una célula de levadura fermentadora de pentosa y glucosa que tiene capacidad de consumo anaeróbico simultáneo de pentosa y glucosa.

7. Proceso para la fermentación de una célula de levadura de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el tiempo de fermentación para la fermentación sustancialmente completa de acetato, pentosa y hexosa se reduce con respecto a la fermentación correspondiente de la levadura de tipo silvestre.

8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el tiempo de fermentación se reduce un 40 % o más.

9. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que se cofermentan pentosa y glucosa.

10. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que la tasa de producción global de etanol es al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 50 % o aproximadamente un 100 % mayor que la de un proceso con la levadura de tipo silvestre correspondiente.

11. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que el hidrolizado de material lignocelulósico se fermenta.

12. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el hidrolizado es un hidrolizado enzimático de material lignocelulósico.

13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el hidrolizado comprende acetato.

14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el hidrolizado que comprende acetato tiene una concentración de acetato de un 5 % (p/p) o más.

Fig. 1

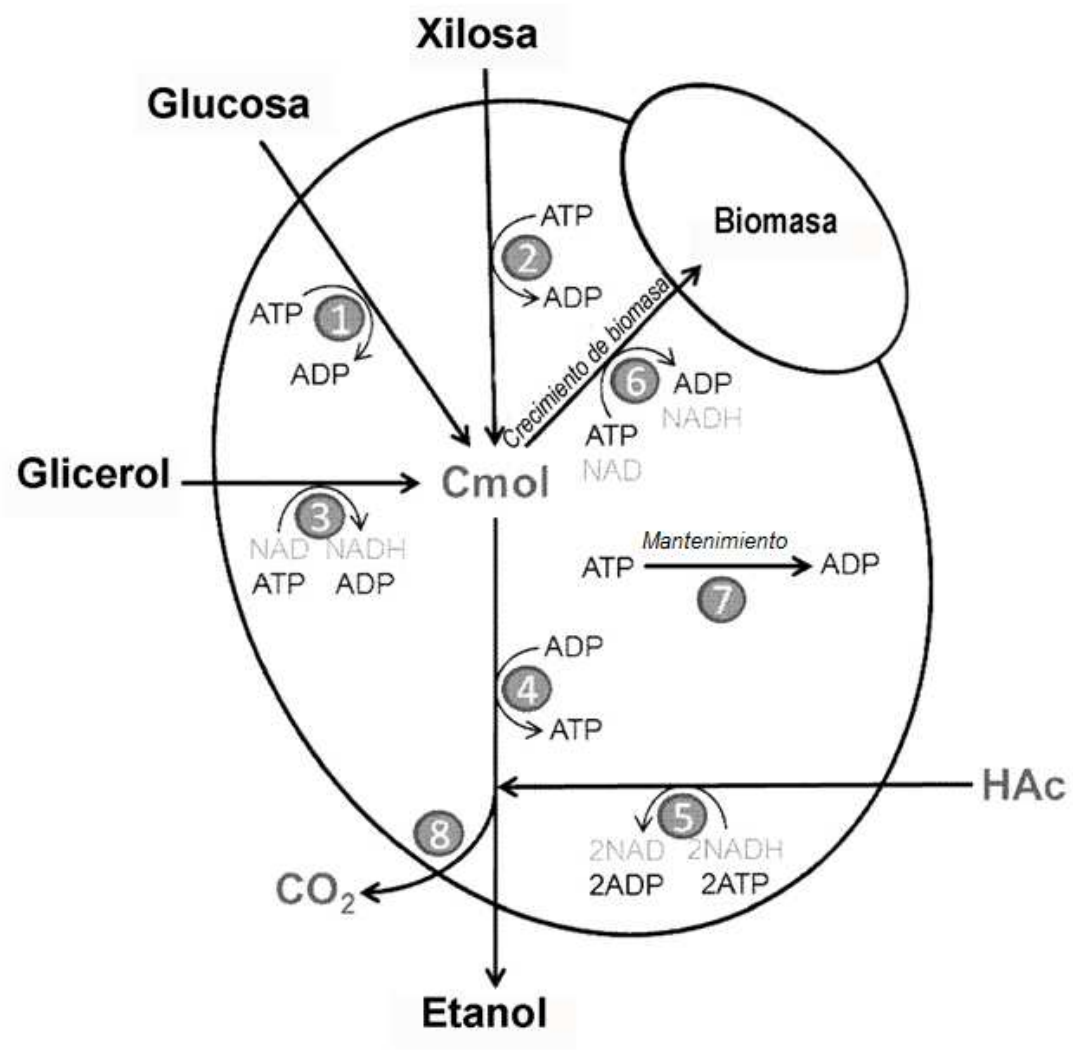

Xilosa
Glucosa
Biomasa
ATP
2
ADP
ATP
1
ADP
Crecimiento de biomasa
6
ADP
NADH
ATP
NAD
Glicerol
Cmol
3
NAD NADH
ATP ADP
Mantenimiento
ATP
ADP
7
ADP
4
ATP
HAc
8
5
2NAD 2NADH
2ADP 2ATP
CO_2
Etanol

Fig. 2

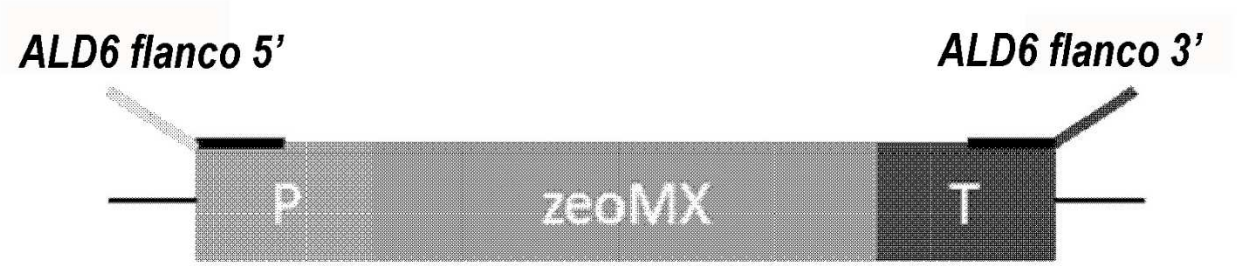

ALD6 flanco 5'
ALD6 flanco 3'
P
zeoMX
T

Fig. 3

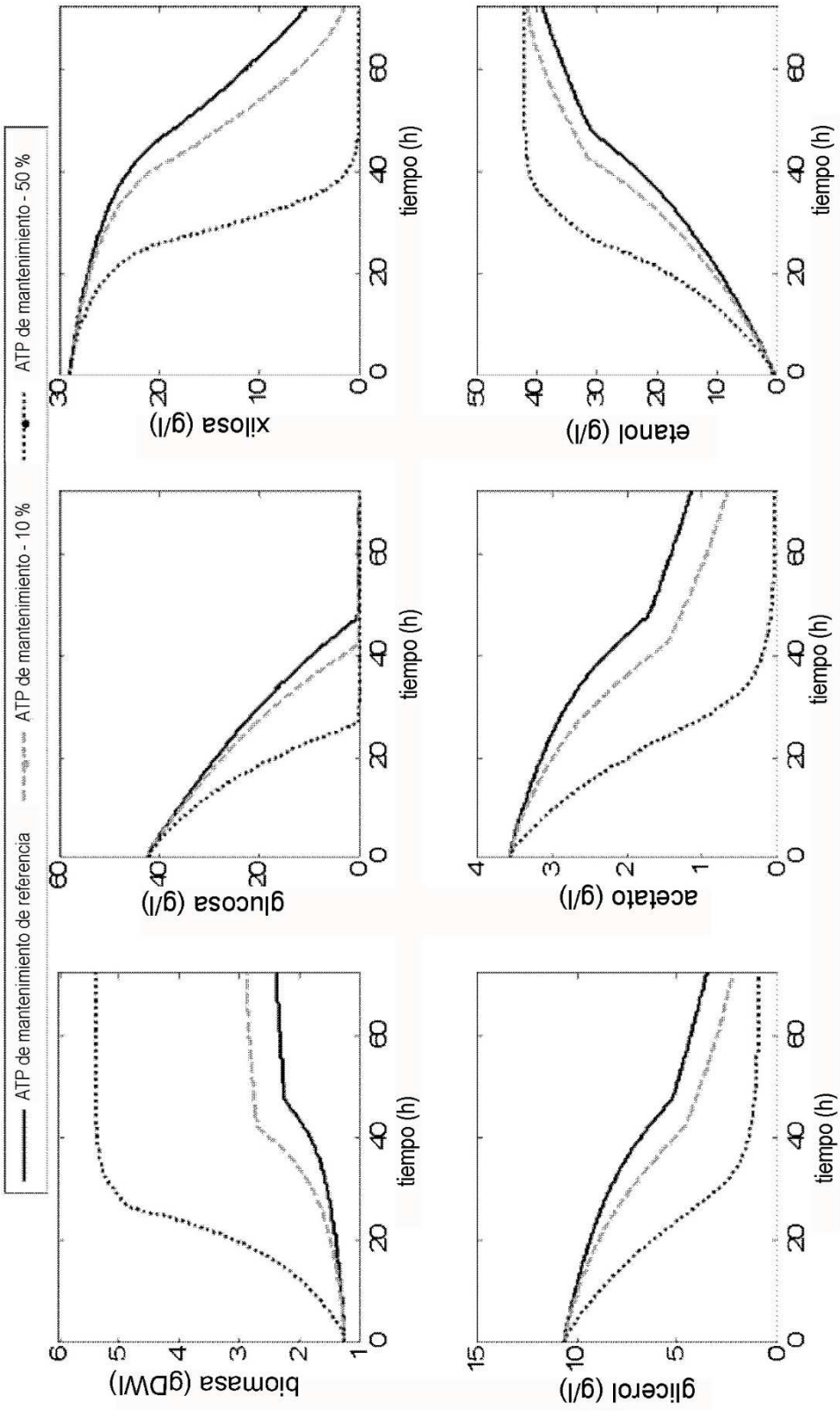

ATP de mantenimiento de referencia
ATP de mantenimiento - 10 %
ATP de mantenimiento - 50 %
biomasa (gDWI)
glucosa (g/l)
xilosa (g/l)
glicerol (g/l)
acetato (g/l)
etanol (g/l)
tiempo (h)

Fig. 4

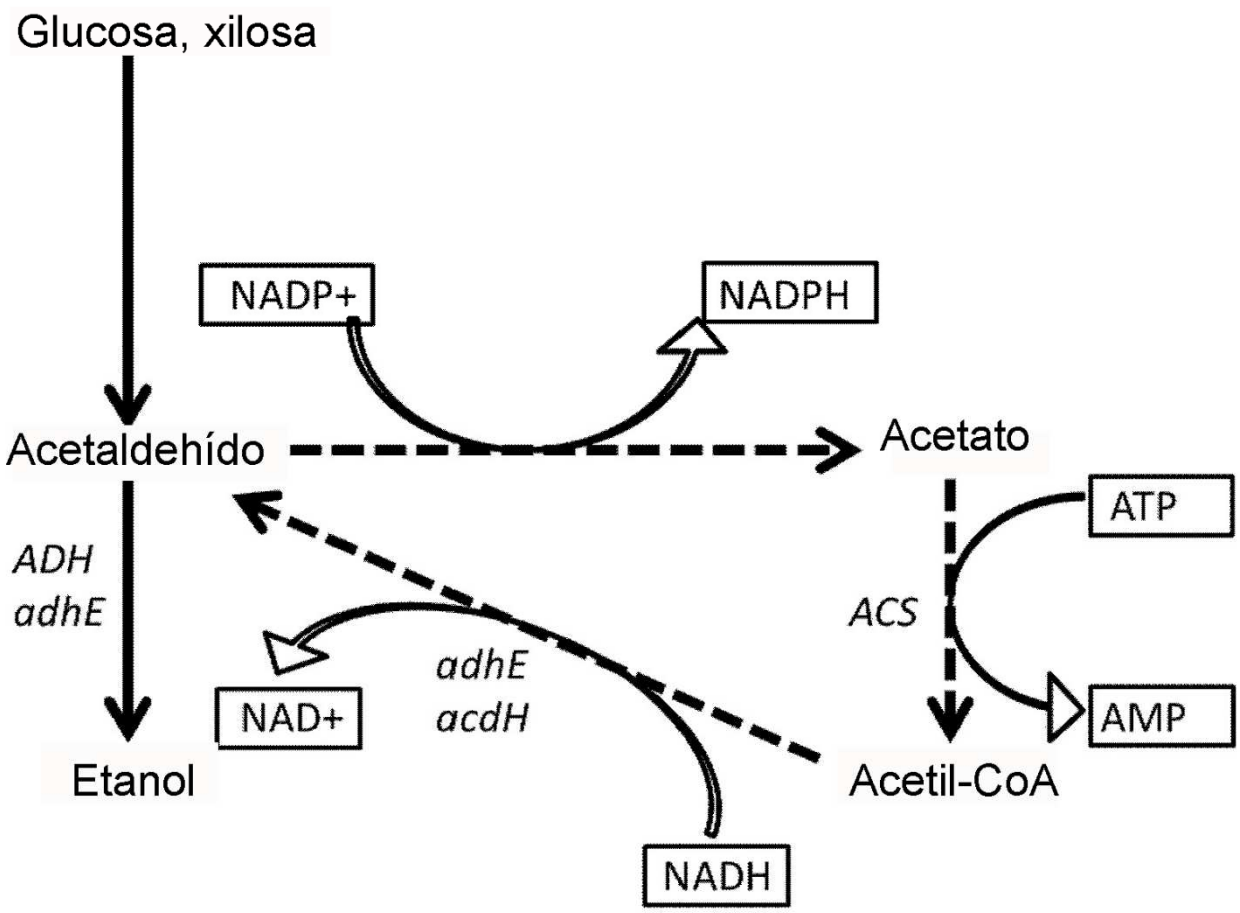
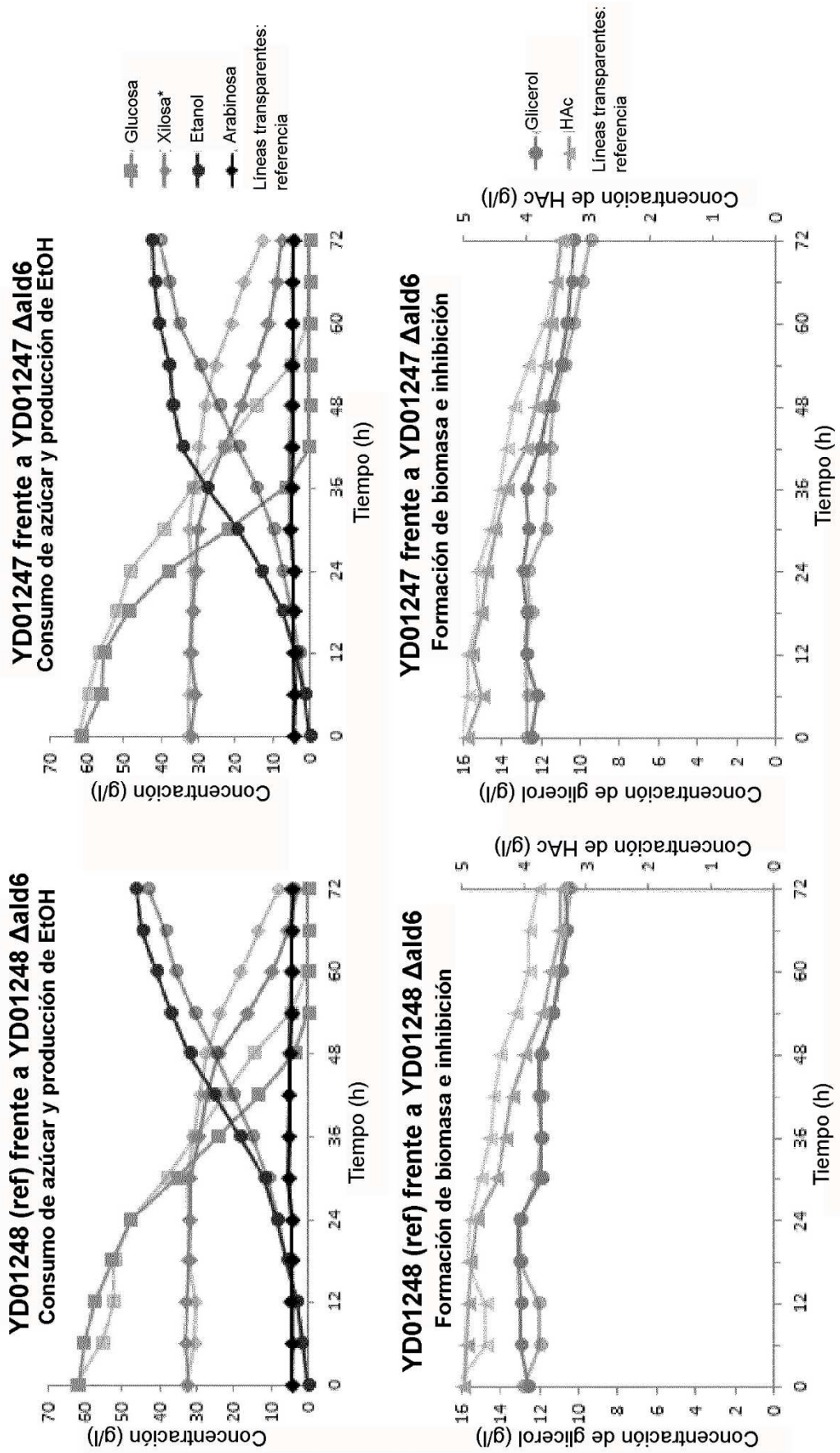
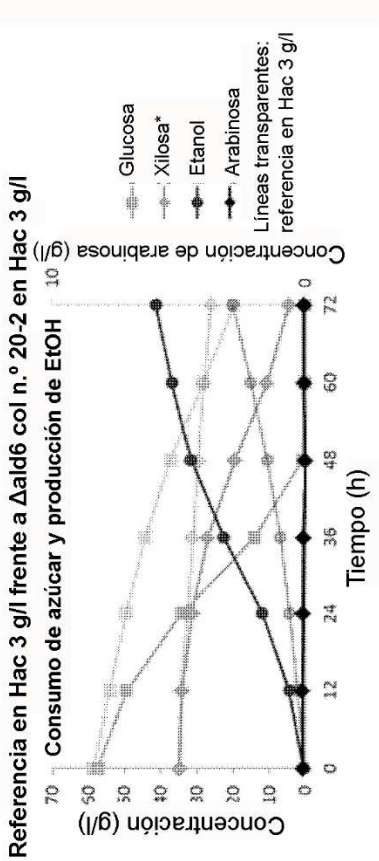
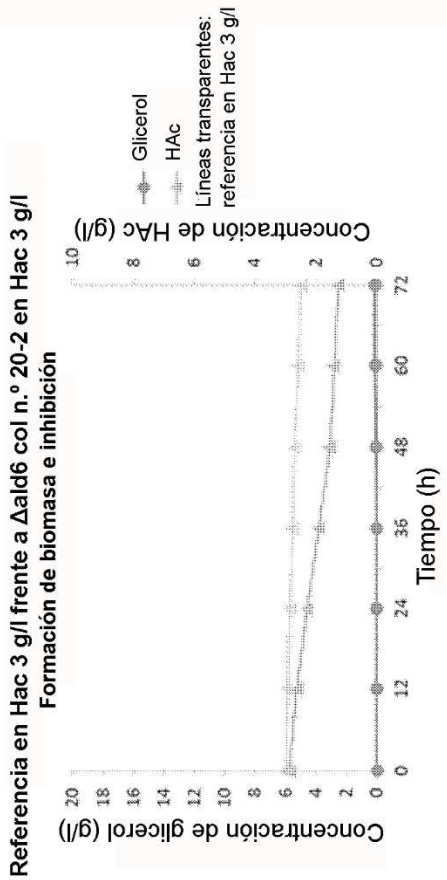
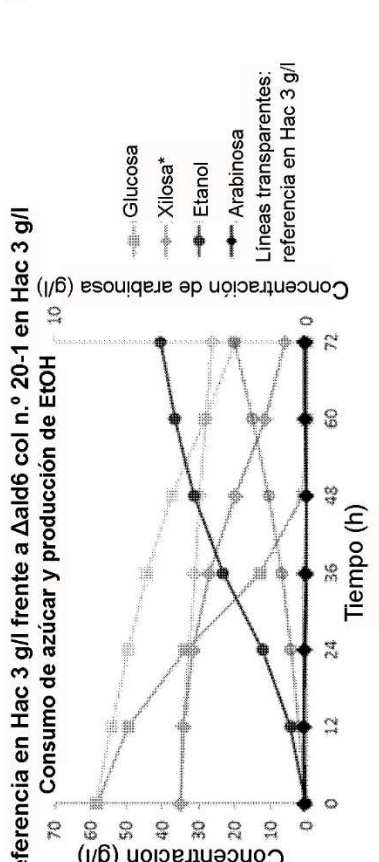

Glucosa, xilosa
NADP+
NADPH
Acetaldehído
Acetato
ATP
ADH
adhE
ACS
adhE
acdH
NAD+
AMP
Etanol
Acetil-CoA
NADH

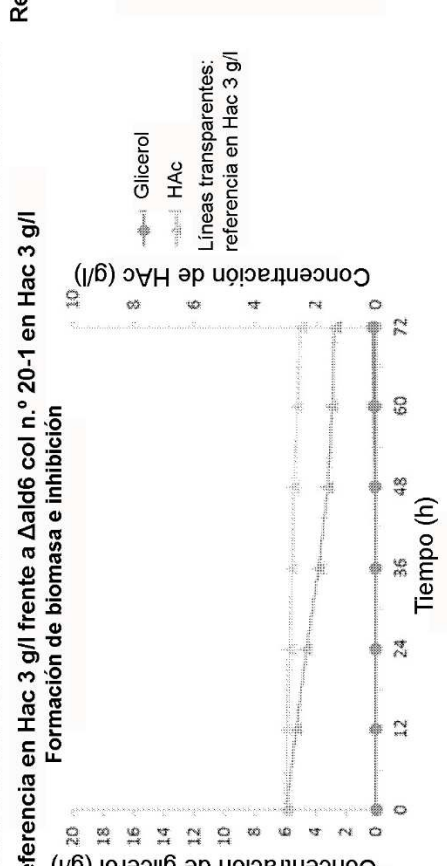
Fig. 5

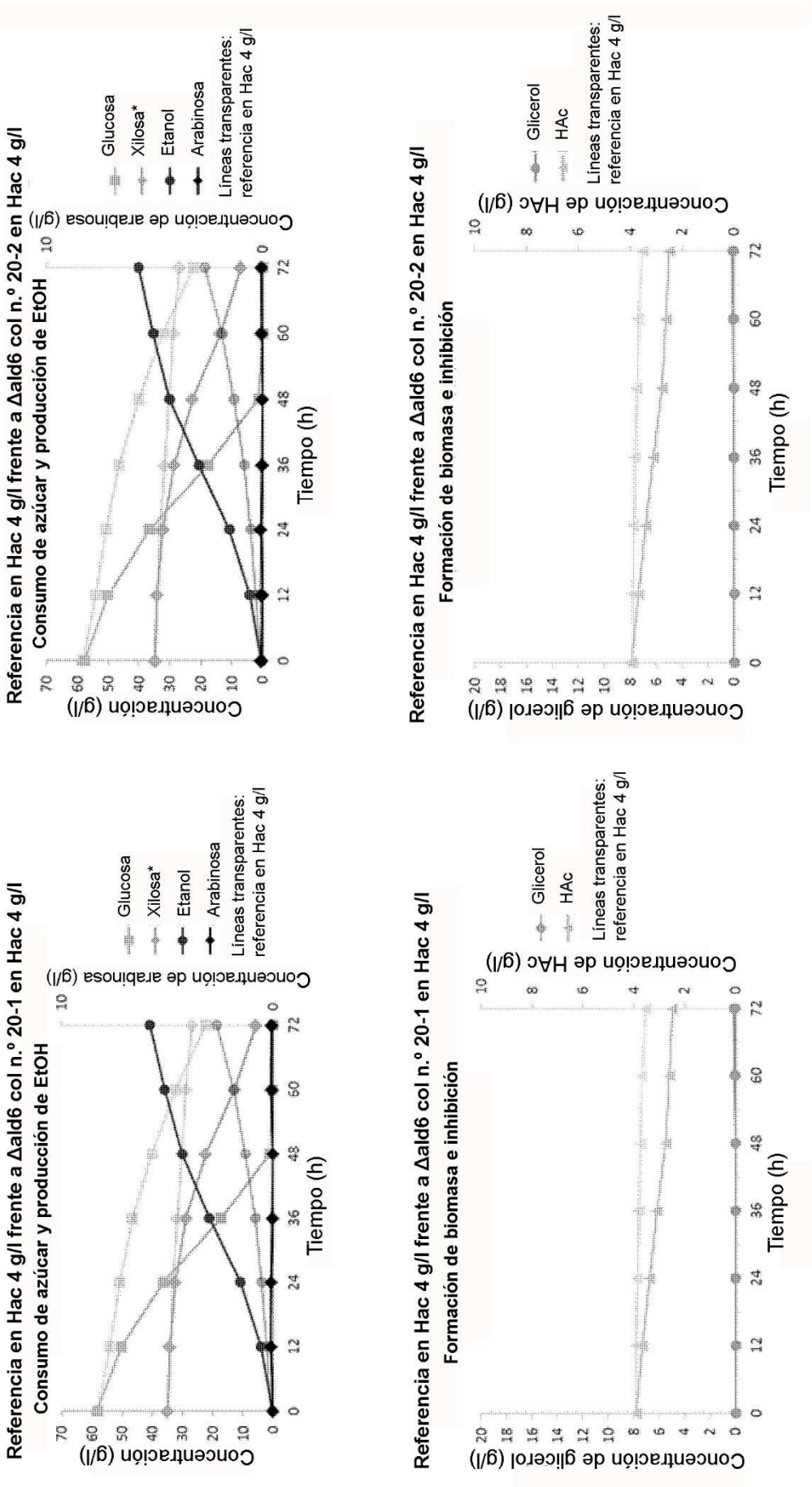

YD01248 (ref) frente a YD01248 Δald6
Consumo de azúcar y producción de EtOH
YD01247 frente a YD01247 Δald6
Consumo de azúcar y producción de EtOH
Glucosa
Xilosa*
Etanol
Arabinosa
Líneas transparentes: referencia
Concentración (g/l)
Tiempo (h)
YD01248 (ref) frente a YD01248 Δald6
Formación de biomasa e inhibición
YD01247 frente a YD01247 Δald6
Formación de biomasa e inhibición
Glicerol
HAc
Líneas transparentes: referencia
Concentración de glicerol (g/l)
Concentración de HAc (g/l)


Referencia en Hac 3 g/l frente a Δald6 col n.º 20-2 en Hac 3 g/l
Consumo de azúcar y producción de EtOH
Concentración (g/l)
Tiempo (h)
Glucosa
Xilosa*
Etanol
Arabinosa
Líneas transparentes: referencia en Hac 3 g/l


Referencia en Hac 3 g/l frente a Δald6 col n.º 20-2 en Hac 3 g/l
Formación de biomasa e inhibición
Concentración de glicerol (g/l)
Concentración de HAc (g/l)
Tiempo (h)
Glicerol
HAc
Líneas transparentes: referencia en Hac 3 g/l


Referencia en Hac 3 g/l frente a Δald6 col n.º 20-1 en Hac 3 g/l
Consumo de azúcar y producción de EtOH
Concentración (g/l)
Tiempo (h)
Glucosa
Xilosa*
Etanol
Arabinosa
Líneas transparentes: referencia en Hac 3 g/l


Referencia en Hac 3 g/l frente a Δald6 col n.º 20-1 en Hac 3 g/l
Formación de biomasa e inhibición
Concentración de glicerol (g/l)
Concentración de HAc (g/l)
Tiempo (h)
Glicerol
HAc
Líneas transparentes: referencia en Hac 3 g/l


Referencia en Hac 4 g/l frente a Δald6 col n.º 20-1 en Hac 4 g/l
Consumo de azúcar y producción de EtOH
Concentración (g/l)
Concentración de arabinosa (g/l)
Tiempo (h)
Glucosa
Xilosa*
Etanol
Arabinosa
Líneas transparentes: referencia en Hac 4 g/l
Referencia en Hac 4 g/l frente a Δald6 col n.º 20-2 en Hac 4 g/l
Consumo de azúcar y producción de EtOH
Concentración (g/l)
Concentración de arabinosa (g/l)
Tiempo (h)
Glucosa
Xilosa*
Etanol
Arabinosa
Líneas transparentes: referencia en Hac 4 g/l
Referencia en Hac 4 g/l frente a Δald6 col n.º 20-1 en Hac 4 g/l
Formación de biomasa e inhibición
Concentración de glicerol (g/l)
Concentración de HAc (g/l)
Tiempo (h)
Glicerol
HAc
Líneas transparentes: referencia en Hac 4 g/l
Referencia en Hac 4 g/l frente a Δald6 col n.º 20-2 en Hac 4 g/l
Formación de biomasa e inhibición
Concentración de glicerol (g/l)
Concentración de HAc (g/l)
Tiempo (h)
Glicerol
HAc
Líneas transparentes: referencia en Hac 4 g/l