



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 307 165**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 1/19 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **05728073 .7**

⑧6 Fecha de presentación : **24.03.2005**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1727890**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

⑤4 Título: **Xilosa reductasa mutada en la fermentación de xilosa por *S. cerevisiae*.**

③0 Prioridad: **26.03.2004 SE 0400816**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

⑦3 Titular/es: **Scandinavian Technology Group AB.
c/o Forskarpatent I Syd AB. Ideon
223 70 Lund, SE**

⑦2 Inventor/es: **Gorwa-Grauslund, Marie-Françoise y
Jeppson, Marie**

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Xilosa reductasa mutada en la fermentación de xilosa por *S. cerevisiae*.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que tiene propiedades mejoradas de fermentación de xilosa a etanol.

10 **Antecedentes de la invención**

El etanol es producido eficazmente a partir de hexosas por *Saccharomyces cerevisiae*, pero se necesitan cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes susceptibles de utilización de xilosa para ampliar la gama de sustrato a un producto hidrolizado lignocelulósico. Mediante la integración de los genes *XYL1* y *XYL2* de *Pichia stipitis* que codifican la xilosa reductasa (XR) y la xilitol deshidrogenasa (XDH) y el gen *XKS1* endógeno que codifica la xiluloquinasa (XK), se han obtenido cepas de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilosa estables. No obstante, el xilitol es secretado como resultado de la diferencia en el uso de cofactores entre las etapas de la XR dependiente de NAD(P)H y la XDH estrictamente dependiente de NAD⁺.

Debido a su utilización dual de cofactores, se ha preferido la XR de *P. stipitis* para la construcción de cepas de *S. cerevisiae* recombinantes fermentadoras de xilosa. En la actualidad ninguna XR conocida puede reducir la xilosa a xilitol con NADH como único cofactor. Entre las levaduras que utilizan xilosa naturales la XR de *Candida utilis* utiliza exclusivamente NADPH, mientras las XR de *C. shehatae*, *P. segobiensis*, *P. stipitis* y *Pachysolen tannophilus* utilizan tanto NADPH como NADH en la reducción de xilosa a xilitol. La XR de *C. parapsilosis* también utiliza tanto NADPH como NADH para la reducción de xilosa, pero a diferencia de otras levaduras prefiere NADH. Solamente las levaduras que albergan actividad xilosa reductasa unida a NADH presentan una fermentación alcohólica significativa.

El rendimiento de etanol en las cepas de *S. cerevisiae* recombinantes que fermentan xilosa está lejos del máximo teórico de 0,51 g g⁻¹, debido parcialmente a que una fracción significativa de la xilosa consumida es secretada en forma de xilitol. La formación de xilitol en *P. tannophilus* ha sido reducida mediante la adición de aceptores de hidrógeno. Estos compuestos re-oxidaban NAD⁺, que es necesario en la reacción de la XDH. La formación de xilitol en *S. cerevisiae* recombinante se ha reducido por medio de la adición de acetoína, furfural y acetaldehído. La formación de xilitol también ha disminuido desplazando el uso de cofactores en la etapa de la XR de NADPH a NADH. Esto se logró cambiando la reserva intracelular de NADPH bloqueando o reduciendo el flujo de la ruta oxidativa de la pentosa fosfato (PPP) por medio de la modificación de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esto dio como resultado un mayor rendimiento de etanol a expensas del deterioro de la velocidad de crecimiento y la disminución de la velocidad de consumo de xilosa.

El gen *XYL1* ha sido sometido a mutagénesis de sitio específico para reducir la afinidad de XR por el NADPH (Zhang y Lee, 1997, Site-directed mutagenesis of the cystein residues in the *Pichia Stipitis* Xylose reductase. FEMS Microbiol Lett 147:227-232, y Kostrzynska *et al* 1998, Mutational analysis of the role of the conserved lysine 270 in the *Pichia Stipitis* xylose reductase, FEMS Microbiol Lett. 159:107-112). Los estudios de modificación química sobre XR demostraron que los restos cisteína e histidina podrían estar implicados en la unión del NADPH. No obstante, la mutación de tres restos cisteína (Cys19, Cys27 y Cys130) por serina potenciaron la Km aparente para el NADPH menos de 4 veces, indicando que ninguno de estos restos cisteína estaba directamente implicado en la unión del NADPH. Se obtuvo una afinidad 17 veces más baja para NADPH cuando el gen *XYL1* portaba la mutación K270M (lisina → metionina), mientras la afinidad para NADH permanecía sin cambios. La única diferencia entre NADPH y NADH es la presencia de un grupo fosfato en el NADPH, y esto sugirió que Lys270 se unía al grupo fosfato de NADPH.

También se han realizado intentos para cambiar la especificidad del cofactor de XDH a NADP⁺. Se introdujo una secuencia de reconocimiento de NADP⁺ de *Thermoanaerobium brockii* en el gen *XYL2* dando como resultado valores de Km aparente iguales para NAD⁺ y NADP⁺. Sin embargo, esto se logró a expensas de una reducción de la especificidad para NAD⁺ combinada con una especificidad para NADP⁺ inalterada. El gen *XYL2* mutado mediaba el crecimiento de xilosa cuando se expresaba simultáneamente con el gen *XYL1* en *S. cerevisiae* si bien no se informó de una fermentación etanólica de xilosa.

Compendio de la presente invención

La presente invención se refiere a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* novedosas que expresan el gen *XYL1* de *P. stipitis* mutado K270M (Kostrzynska *et al* 1998) a dos niveles diferentes junto con el gen *XYL2* de *P. stipitis* nativo y el gen *XKS1* endógeno expresado en exceso. Las cepas se compararon con las cepas que expresaban el gen *XYL1* de *P. stipitis* nativo junto con los genes *XYL2* y *XKS1*, en cuanto al consumo de xilosa y la formación de etanol.

Materiales y métodos

Cepas

- 5 Se utilizó *Escherichia coli* DH5 α (Life Technologies, Rockville, MD, USA) para la subclonación. Todas las cepas se almacenaron en glicerol del 20% a -80°C. Se utilizaron células de levadura de placas YPD recién sembradas en estrías para la inoculación. Las cepas de levadura se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1

Cepas de levadura utilizadas en la presente investigación

Cepas	Genotipo relevante	Fenotipo relevante	Referencia
TMB3001	CEN.PK 113-7A (<i>MATα his3-Δ1 MAL2-8c SUC2</i>) <i>his3::Ylp</i> XR/XDH/XK	Produce XR, XDH y XK	(1)
TMB3260	TMB3001 <i>XYL1::pB3PGK XYL1</i>	Produce XR en exceso	(2)
TMB3265	CEN.PK 113-11C (<i>MATα his3-Δ1 ura3-52 MAL2-8c SUC2</i>) <i>his3::YlpXDH/XK</i>	Produce XDH y XK	(3)
TMB3270	TMB3265 <i>ura3::Ylplac211 PGK XYL1(K270M)</i>	Produce XR mutada	Este trabajo
TMB3271	TMB3270 <i>XYL1::pB3 PGK XYL1 (K270M)</i>	Produce XR mutada en exceso	Este trabajo

Manipulación del ácido nucleico

- 40 Se preparó ADN plasmídico con un Biorad Plasmid Miniprep Kit (Hercules, CA, USA). Las enzimas de restricción y modificación se obtuvieron de Fermentas (Vilnius, Lituania). Se utilizó QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmBH, Hilden, Alemania) para las extracciones de ADN a partir de agarosa.

Transformación

- 45 Se prepararon células competentes de *E. coli* DH5 α y se transformaron mediante el método de Inoue. La transformación de levadura se realizó utilizando el método del acetato de litio. Las células de levadura se incubaron durante la noche en medio YPD antes de ser sembradas en estrías en medio selectivo. Los transformantes de *E. coli* se seleccionaron sobre placas de Luria-Bertani (LB) con 100 μ g ml⁻¹ de ampicilina (IBI Shelton Scientific Inc., Shelton, CT, USA). Los transformantes de *S. cerevisiae* se seleccionaron sobre placas con Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids (Difco, Sparks, MD) que contenía 20 g l⁻¹ de glucosa y 50 mg l⁻¹ de uracilo o en placas de YPD con 100 μ g ml⁻¹ de zeocina (Invitrogen, Groningen, Holanda).

Construcción de una nueva cepa TMB3270

- 55 Se separaron cortando el promotor y el terminador de *PGK1* a partir de PGK pB3 utilizando *NarI* y *SacI*, y se insertaron en *Ylplac211* utilizando los mismos sitios, dando como resultado *Ylplac211 PGK*. La *XYL1* mutada (K270M) se amplificó a partir de pSX (K270M) utilizando los cebadores descritos previamente añadiendo sitios *BamHI* en ambos extremos. El producto de la PCR *XYL1* se cortó con *BamHI* y se insertó después del promotor de *PGK1* en el sitio *BglII* de *Ylplac211 PGK*, dando como resultado *Ylplac211 PGK XYL1 (K270M)*. La correcta orientación se verificó mediante PCR y la corrección del vector se verificó mediante análisis de restricción.

- 60 Se escindió *Ylplac211 PGK XYL1 (K270M)* con *Bpu101* dentro del gen *URA3*. El producto de la escisión se utilizó para la transformación de TMB3265 (XDH-XK) dando como resultado TMB3270. La integración en el locus correcto de TMB3270 se verificó con una PCR, utilizando el cebador 5' CAC GGA AAT GTT GAA TAC TCA TAC TC 3' que hibrida con el vector *Ylplac211 PGK XYL1 (K270M)* y 5' GTT ACT TGG TTC TGG CGA GGT A 3' que hibrida aguas abajo del gen *URA3* en el genoma de levadura. La mutación K270M se verificó mediante secuenciación.

Construcción de una nueva cepa TMB3271

El promotor y el terminador de PGK1 junto con el gen de *XYL1* (K270M) se separaron por corte de YIplac211 PGK *XYL1* (K270M) utilizando *NarI* y *SacI*. El fragmento se insertó en pB3 PGK después de la eliminación del promotor y el terminador de *PGK1* con *NarI* y *SacI*, dando como resultado pB3 PGK *XYL1* (K270M). La corrección del vector se verificó mediante análisis de restricción y la mutación K270M se verificó mediante secuenciación. El plásmido se escindió con *BshTI* dentro el gen *XYL1*. El plásmido escindido se utilizó para la integración en el gen *XYL1* K270M de TMB3270. El transformante TMB3271 se seleccionó sobre placas YPD con zeocina.

10 *Fermentación por lotes*

Se llevó a cabo la fermentación por lotes con oxígeno limitado de la xilosa como se ha descrito previamente (Jeppsson, M., B. Johansson, B. Hahn-Hägerdal, y M. Gorwa Grauslund. 2002. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. Appl. Environ. Microbiol. 68:1604-1509).

Cultivo continuo

Se utilizaron células de un cultivo durante la noche para la inoculación de 1,5 l de medio mineral definido (30) con 10 g l⁻¹ de glucosa y 10 g l⁻¹ de xilosa en un fermentador Bioflo-III (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Se añadió antiespumante al 0,05% (v/v) (Dow Corning® Antifoam RD Emulsion, BDH Laboratory Supplies, Poole, UK). Después de agotar la glucosa, se ajustó el cultivo continuo con 10 g l⁻¹ de glucosa y 10 g l⁻¹ de xilosa a una velocidad de dilución de 0,06 h⁻¹ a 30°C y un pH de 5,5 controlado mediante KOH 3 M. Las condiciones anaerobias se obtuvieron purgando el fermentador con 0,2 l min⁻¹ de nitrógeno (que contenía menos de 5 ppm de O₂) medido con un medidor de flujo de la masa de gas (Bronkhorst, Ruurlo, Holanda) y se utilizó una velocidad de agitación de 200 rpm.

Análisis

Las concentraciones de sustrato y producto, el peso seco celular, el ARN, las proteínas y los carbohidratos se midieron como se ha descrito antes (Jeppsson, *supra*). Se utilizó el modelo de flujo estequiométrico desarrollado previamente (3) para evaluar el uso del cofactor por XR.

Actividades enzimáticas

Se determinaron las actividades enzimáticas en las células de cultivos en matraces con movimiento oscilatorio que crecían exponencialmente en medio mineral definido (Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. y Van Dijken, J.P. 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) con 20 g l⁻¹ de glucosa como fuente de carbono. Los pre-cultivos se prepararon en las mismas condiciones. Los extractos brutos se obtuvieron utilizando el reactivo YPER (Pierce, Rockford, IL, USA). La concentración de proteína se determinó utilizando el reactivo de análisis de proteínas de Coomassie (Pierce) con seralbúmina bovina como patrón. Se determinó la actividad XR como se ha descrito previamente (Eliasson, A., C. Christensson, C.F. Wahlborn, y B. Hahn-Hägerdal. 2000, Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2* y *XKS1* in mineral medium chemostat cultures Appl. Environ. Microbiol. 66:3381-3386) excepto para las cepas que portaban la XR mutada, donde se utilizaron xilosa 1,05 M y NADPH 0,3 mM.

Resultados50 *Efecto de la mutación XYL1 K270M sobre la fermentación de xilosa*

Kostrzynska *et al.* (1998) sometieron la XR de *P. stipitis* a mutagénesis de sitio específico con el fin de modificar la afinidad para NADPH. La mutación en la posición del aminoácido 270 dio como resultado una Km aparente de 185 μM para el NADPH, que es 17 veces superior que la Km aparente para el NADPH de la XR nativa (11 μM). No obstante, la mutación en XR K270M también aumentaba la Km aparente para la xilosa 15 veces (625 mM frente a 43 mM), mientras la Km aparente para NADH no resultaba afectada (31 μM frente a 27 μM).

Se introdujo el gen *XYL1* K270M en la cepa *S. cerevisiae* TMB3265 que ya albergaba *XYL2* de *P. stipitis* y los genes *XKS1* expresados en exceso endógenamente, dando como resultado la cepa TMB3270. La actividades de XR dependientes de NADPH y NADH fueron 0,74 y 0,63 U mg⁻¹, respectivamente, en TMB3270 (Tabla 2). En la cepa de control TMB3001, que alberga el gen *XYL1* nativo junto con los genes *XYL2* y *XKS1*, hubo unas actividades dependientes de NADPH y NADH de 0,48 y 0,31 U mg⁻¹, respectivamente.

65

TABLA 2

Actividad XR específica ($U\ mg\ prote\acute{i}na^{-1}$) para TMB3001, TMB3260, TMB3270 y TMB3271. Los datos mostrados son los valores medios de dos medidas con una variaci3n de menos de 10%

Cepas	XR (U/mg) NADPH	NADH
TMB3001 (1 copia de <i>XYL1</i>)	0,48	0,31
TMB3260 (2 copias de <i>XYL1</i>)	3,11	1,63
TMB3270 (1 copia de <i>XYL1</i> (K270M))	0,74	0,63
TMB3271 (1 copias de <i>XYL1</i> (K270M))	4,04	1,50

La formaci3n de producto a partir de xilosa se analiz3 en una fermentaci3n por lotes con c3lulas en reposo desarrolladas en glucosa utilizando xilosa en condiciones de ox\geno limitado (Tabla 3). En estas condiciones se forma muy poca biomasa. TMB3270 (*XYL1* K270M) ten\fa una velocidad de consumo de xilosa ($0,155\ g\ biomasa^{-1}\ h^{-1}$) muy similar a la de TMB3001 ($0,145\ g\ biomasa^{-1}\ h^{-1}$). El rendimiento de etanol ($0,36\ g\ g^{-1}$) aument3 y el rendimiento de xilitol ($0,17\ g\ g^{-1}$) se redujo en TMB3270 en comparaci3n con la cepa de control TMB3001 ($0,31\ g\ etanol\ g\ xilosa^{-1}$, $0,29\ g\ xilitol\ g\ xilosa^{-1}$). Los rendimientos de acetato y glicerol fueron bajos, pero superiores en TMB3270 ($0,035\ g\ g^{-1}$, $0,072\ g\ g^{-1}$) que en TMB3001 ($0,025\ g\ g^{-1}$, $0,052\ g\ g^{-1}$).

TMB3270, que albergaba la XR mutada, consumi3 xilosa de un modo similar a la cepa de control TMB3001 en el cultivo por lotes con $50\ g/l$ de xilosa. Sin embargo, la inferior afinidad por la xilosa de la XR mutada podr\fa reducir la velocidad de consumo de xilosa a bajas concentraciones de xilosa. La mutaci3n tambi3n podr\fa influir en la formaci3n de producto durante la fermentaci3n simult\nea de la glucosa y la xilosa. Por lo tanto se llev3 a cabo el cultivo continuo anaerobio con TMB3001 y TMB3270 a $10\ g\ l^{-1}$ de glucosa y $10\ g\ l^{-1}$ de xilosa (Tabla 4). TMB3270 (*XYL1* K270M) tuvo una velocidad de consumo de xilosa un 58% inferior que la cepa de control TMB3001. Los rendimientos de etanol y CO_2 fueron aproximadamente un 10% superiores en TMB3270 ($0,40$ y $0,48\ g\ sustrato^{-1}$) que en TMB3001 ($0,37$ y $0,43\ g\ g\ de\ sustrato^{-1}$). TMB3270 tuvo un rendimiento de xilitol reducido por xilosa consumida ($0,31\ g\ g\ xilosa^{-1}$) en comparaci3n con TMB3001 ($0,52\ g\ g\ xilosa^{-1}$), lo que coincide con los resultados de la fermentaci3n por lotes (Tabla 3). TMB3270 tambi3n tuvo un rendimiento de glicerol inferior ($0,084\ g\ g\ sustrato^{-1}$) que TMB3001 ($0,095\ g\ g\ sustrato^{-1}$), mientras el rendimiento de acetato fue ligeramente superior en TMB3270 ($0,002\ g\ g\ sustrato^{-1}$) en comparaci3n con TMB3001 ($0,001\ g\ g\ sustrato^{-1}$). Los rendimientos de biomasa fueron similares en las dos cepas ($0,094$ y $0,095\ g\ g\ sustrato^{-1}$). La formaci3n de biomasa fue de $1,1$ y $1,0\ g\ l^{-1}$ en TMB3001 y TMB3270, respectivamente.

(Tabla pasa a p\gina siguiente)

TABLA 3

Efecto sobre la disminución de la afinidad de XR por NADPH en la fermentación de xilosa por S. cerevisiae recombinante en lotes con oxígeno limitado con 50 g l⁻¹ de xilosa como única fuente de carbono. La velocidad de consumo de xilosa específica (g x g de biomasa⁻¹ x h⁻¹) y los rendimientos de etanol, xilitol, acetato y glicerol (g x g de xilosa consumida⁻¹) y las recuperaciones de carbono (cmoles fuera (cmoles dentro)⁻¹) se determinaron al cabo de 60-70 horas. Los valores presentados son la media de los experimentos de fermentación independientes mas/menos la desviación de la media. En el cálculo de la recuperación de carbono se supone que se forman 0,5 moles de CO₂ por cada cmol de etanol o acetato producido

Cepas	Velocidad de consumo de xilosa	R Etanol	R Xilitol	R Acetato	R Glicerol	Recuperación de C
TMB3001 ¹ (1 copia de XYL1)	0,145 ± 0,002	0,31 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,025 ± 0,001	0,052 ± 0,004	0,98
TMB3260 ² (2 copias de XYL1)	0,245 ± 0,005	0,30 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,046 ± 0,007	0,161 ± 0,001	0,95
TMB3270 (1 copia de XYL1 (K270M))	0,155 ± 0,005	0,36 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,035 ± 0,001	0,072 ± 0,005	0,99
TMB3271 (2 copias de XYL1 (K270M))	0,226 ± 0,020	0,31 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,060 ± 0,008	0,181 ± 0,014	0,97

Datos de fermentación de ¹(12) y ²(14).

Efecto del aumento de expresión de XYL1 K270M sobre la fermentación de xilosa

Se ha demostrado que TMB3001 utiliza tanto NADPH como NADH en la reacción de XR. La formación de producto en el cultivo por lotes (Tabla 3) y continuo (Tabla 4) indicó que el aumento del valor de Km para NADPH de la XR mutada en TMB3270 daba como resultado un uso reducido de NADPH en la etapa de XR. Puesto que la actividad dependiente de NADH era similar en las dos cepas (Tabla 2), una actividad demasiado baja de XR podría explicar el consumo de xilosa inferior en TMB3270. Se ha demostrado previamente que la actividad XR limitaba la velocidad de consumo de xilosa en TMB3001.

TABLA 4. Cultivo continuo de TMB3001, TMB3270, TMB3260 y TMB3271 en condiciones anaerobias a una velocidad de dilución de $0,06 \text{ h}^{-1}$ con 10 g l^{-1} de glucosa y 10 g l^{-1} de xilosa como fuente de carbono. Se muestran las velocidades de consumo ($\text{g g de biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$), los rendimientos ($\text{g g de sustrato consumido}^{-1}$) y la recuperación de C. Se supone un estado estacionario después de que haya pasado por el fermentador al menos 6 veces el volumen del fermentador

Cepas	Velocidad constante glucosa	Velocidad constante Xilosa	R Etanol	R Xilitol	R Xilitol*	R Acetato	R Glicerol	R CO_2	R Biomasa	Recuperación de C
TMB3001 (1 copia de XYL1)	0,52	0,12	0,37	0,10	0,52	0,001	0,095	0,43	0,094	1,08
TMB3260 (2 copias de XYL1)	0,51	0,19	0,36	0,16	0,58	0,004	0,107	0,39	0,085	1,09
TMB3270 (1 copia de XYL1 (K270M))	0,58	0,05	0,40	0,02	0,31	0,002	0,084	0,48	0,095	1,07
TMB3271 (2 copias de XYL1 (K270M))	0,45	0,16	0,40	0,12	0,44	0,003	0,053	0,40	0,098	1,07

*Rendimiento de xilitol sobre xilosa

Se integró otra copia del gen *XYL1* mutado (K270M) en TMB3270, dando como resultado TMB3271. La actividad XR dependiente de NADPH y NADH en TMB3271 fue 4,04 y 1,50 U mg⁻¹, respectivamente, que es 2-5 veces superior que en TMB3270 (Tabla 2). La cepa TMB3260 de elevada actividad XR fue incluida como cepa de control para TMB3271 en esta investigación. TMB3260 albergaba dos copias del gen *XYL1* nativo junto con los genes *XYL2* y *XKS1*, y tenía actividades dependientes de NADPH y de NADH de 3,11 y 1,63 U mg⁻¹, respectivamente (Tabla 2).

Se compararon el consumo de xilosa y la formación de producto con TMB3271 (2 copias de *XYL1* (K270M)) con TMB3270 (1 copia de *XYL1* (K270M)), TMB3001 (1 copia de *XYL1*) y TMB3260 (2 copias de *XYL1*) en una fermentación por lotes con oxígeno limitado utilizando células en reposo (Tabla 3). No hubo diferencias significativas entre TMB3260 y TMB3271 que expresaban elevados niveles de *XYL1* y *XYL1* (K270M), respectivamente. Ambas tuvieron una velocidad de consumo de xilosa superior, un descenso en el rendimiento de xilitol, un aumento de los rendimientos de glicerol y acetato, y un rendimiento de etanol similar en comparación con TMB3001.

La formación de producto con TMB3260 y TMB3271, que portaban 2 copias de los genes *XYL1* y *XYL1* (K270M), respectivamente, también fue determinada en un cultivo continuo anaerobio con 10 g l⁻¹ de glucosa y 10 g l⁻¹ de xilosa como fuentes de carbono (Tabla 4). El aumento de actividad XR dio como resultado una absorción de xilosa 58% y 220% superior en TMB3260 y TMB3271 (*XYL1* K270M), en comparación con sus respectivas cepas de actividad XR baja TMB3001 y TMB3270 (*XYL1* K270M). La mutación K270M en TMB3271 dio como resultado un mayor rendimiento de etanol y CO₂ (0,40 g g⁻¹ y 0,40 g g⁻¹) que para la cepa de control TMB3260 (0,36 g g⁻¹ y 0,39 g g⁻¹), que coincide con el aumento de los rendimientos de etanol y CO₂ encontrado a una baja actividad de XR en TMB3270 (Tabla 4). El rendimiento de xilitol fue inferior en TMB3271 (0,44 g xilitol g de xilosa⁻¹) que en TMB3260 (0,58 g xilitol g de xilosa⁻¹). El rendimiento de biomasa fue superior en TMB3271 (0,098 g-g de sustrato⁻¹), que en TMB3260 (0,85 g-g de sustrato⁻¹). La formación de biomasa fue de 1,1 y 1,2 g l⁻¹ en TMB3260 y TMB3271, respectivamente. TMB3271 tuvo un descenso de 2 veces el rendimiento de glicerol y un ligero descenso en el rendimiento de acetato de etilo en comparación con TMB3260.

Análisis de Flujo

Se utilizó un modelo de flujo estequiométrico (3) para elucidar el uso del cofactor por XR en cepas que albergan *XYL1* nativo (TMB3001 y TMB3260) y *XYL1* K270M mutado (TMB3270 y TMB3271), respectivamente. El modelo demostró que las cepas que expresaban XR mutada utilizaban una fracción mayor de NADH en la reacción de XR que las cepas que expresaban XR nativa (Figura 1). De acuerdo con el modelo, la reacción de XR en TMB3001 utilizaba un 47% de NADH, mientras la reacción de XR en TMB3270 (K270M) utilizaba solamente NADH para la reducción. En las cepas con una actividad XR superior, TMB3260 y TMB3271 (*XYL1* K270M), se utilizaba un 36 y un 86% de NADH, respectivamente, en la etapa de XR. La ruta oxidativa de las pentosas fosfato es una fuente principal de NADPH en levadura, y se canalizaba más glucosa por medio de esta ruta en TMB3001 (15%) y TMB3260 (22%) que en TMB3270 (7%) y TMB3271 (12%) que portaban el mutante. Como resultado se formaba menos dióxido de carbono en las cepas que portaban el mutante.

Se ha demostrado previamente que XR reducía la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) con NADPH. El modelo de flujo, sin embargo, suponía una reducción de DHAP estrictamente dependiente de NADH. Cuando la reacción cambiaba en el modelo para utilizar 50% de NADH y 50% de NADPH para la reducción de DHAP, el uso de NADH en la reacción de XR aumentaba para todas las cepas, y era superior en las cepas que portaban XR mutada. Las cepas que portaban XR mutada (TMB3270 y TMB3271) también tenían un flujo de PP oxidativo menor en el modelo cambiado.

Utilizando una XR mutada con una afinidad menor para NADPH, los autores de la presente invención pretendieron el desplazamiento de la formación de producto de xilitol a etanol en *S. cerevisiae* recombinante. TMB3270 y TMB3271 que albergaban la XR mutada mostraron rendimientos de xilitol y glicerol inferiores, acompañados de mayores rendimientos de etanol y CO₂ en comparación con las cepas con XR nativa. El rendimiento de glicerol anaerobio significativamente reducido en TMB3271 resultaba muy probablemente del descenso de la demanda para la reoxidación de NAD⁺ cuando se utiliza principalmente NADH. Un modelo de flujo metabólico demostró que las cepas que albergaban XR mutada utilizaban una fracción mayor de NADH en la reducción de xilosa. El aumento de rendimiento de biomasa encaja con el descenso en el rendimiento de glicerol en TMB3271, puesto que NAD⁺ se consume durante la formación de biomasa y se regenera durante la formación de glicerol.

Se han adoptado numerosos enfoques para mejorar el rendimiento y la productividad de etanol cambiando el metabolismo redox durante la fermentación de xilosa en cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (Tabla 5). Se observaron un aumento del rendimiento de etanol y un descenso del de xilitol (30 y 70%, respectivamente) en TMB3255 interrumpidos en el gen ZWF1 de la PPP oxidativa, como resultado de que se encuentra disponible menos NADPH para la reacción XR (4). También era probable que la producción excesiva de transhidrogenasa de *Azotobacter vinelandii*, que convierte NAD⁺ y NADPH en NADH y NADP⁺ en *S. cerevisiae*, redujera la concentración de NADPH intracelular. La cepa con una producción excesiva de TH mostró un ligero descenso en el rendimiento de xilitol mientras no se observó cambio alguno en el rendimiento de etanol (5).

La expresión de una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) dependiente de NADP⁺ en *S. cerevisiae* aumentó el rendimiento de etanol a partir de xilosa en un 25% (Verho *et al.* 2003). Engineering of redox cofactor metabolism for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol 69: 5892-7). Se sugirió la modificación para dar como resultado un flujo de PPP menos oxidativo y por tanto una producción de CO₂

más baja. El rendimiento de etanol aumentó un 127% cuando el gen *ZWF1* de la PPP oxidativa era interrumpida en combinación con una producción excesiva de GADPH. Sin embargo, el rendimiento de etanol no era mayor que en los otros estudios debido a un bajo rendimiento inicial de la cepa de control.

Tabla 5. Velocidad de consumo de xilosa (g g de biomasa⁻¹), rendimiento de etanol (g g de azúcar⁻¹) y rendimiento de xilitol (g g de xilosa⁻¹) en la fermentación con cepas de *S. cerevisiae* recombinantes diseñadas para aumentar los rendimientos de etanol a partir de xilosa. Se informa sobre el genotipo y el fenotipo relevante, así como sobre la oxigenación, O₂ (Anaerobio (-), Limitación de oxígeno (±)), Modo de fermentación (Cultivo continuo (C), cultivo por lotes (B)) y concentraciones de glucosa (Glu) y xilosa (Xyl) en g l⁻¹.

Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	O ₂	Modo	D	Glu	Xyl	Velocidad consumo xilosa	R _{etanol} (% incremento)	R _{xilitol}	Cepa de referencia	Datos fermentación referencia
TMB3001	1 copia de XYL1	-	C	0,06	10	10	0,12	0,37	0,52	(1)	Este trabajo
TMB3260	2 copias de XYL1	-	C	0,06	10	10	0,19	0,36	0,58	(2)	Este trabajo
TMB3270	1 copia de XYL1 (K270M)	-	C	0,06	10	10	0,05	0,40 (8%)	0,31	Este trabajo	Este trabajo
TMB3271	2 copias de XYL1 (K270M)	-	C	0,06	10	10	0,16	0,40 (11%)	0,44	Este trabajo	Este trabajo
TMB3001		-	C	0,06	20	20	0,23	0,30	0,43	(1)	(4)
TMB3255	$\Delta zwf1$	-	C	0,06	20	20	0,12	0,39 (30%)	0,13	(4)	(4)
TMB3001		±	B	-	-	50	0,15	0,31	0,29	(1)	(4)
TMB3253	Control	±	B	-	-	50	0,16	0,28	0,34	(5)	(5)
TMB3254	TH	±	B	-	-	50	0,16	0,28	0,30	(5)	(5)
H2674	Control	-	B	-	-	50	0,07*	0,14	0,56	(6)	(6)
H2673	GDP1	-	B	-	-	50	0,06*	0,17 (25%)	0,49	(6)	(6)
H2684	GDP1 $\Delta zwf1$	-	B	-	-	50	0,06*	0,31 (127%)	0,35	(6)	(6)
TMB3001		-	C	0,05	20	50	0,31	0,28	0,56	(1)	(7)
CBP.CR4	$\Delta gdh1$ GDH2	-	C	0,05	20	50	0,31	0,34 (19%)	0,47	(7)	(7)
CBP.CR5	$\Delta gdh1$ GS-GOGAT	-	C	0,05	20	50	0,34	0,33 (16%)	0,44	(7)	(7)

* Se suponen 120h de tiempo de cultivo (solo se informó de un tiempo de cultivo aproximado en (31)).

Asimismo se obtuvo un aumento del rendimiento de etanol sobre la xilosa mediante diseño metabólico de la asimilación de amonio (7). El rendimiento de etanol aumentó 19%, y el rendimiento de xilitol disminuyó 16%, suprimiendo el gen *GDH1*, que codifica una glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH, y expresando en exceso el gen *GDH2*, que codifica una glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH. Otra estrategia fue la expresión en exceso de los genes *GLT1* y *GLN1*, que codifican el complejo GS-GOGAT que requiere NADH y ATP, en la cepa con *GDH1* suprimido, lo que dio como resultado un rendimiento de etanol 16% más alto.

Esta investigación demuestra que es posible mejorar el rendimiento de etanol (11% superior en TMB3271 que en TMB3260) a una velocidad de consumo de xilosa mantenida expresando el mutante *XYL1* K270M a un nivel elevado. Las condiciones de cultivo no fueron las mismas en las diferentes investigaciones, pero puesto que TMB3001 había sido incluida en todos los casos excepto para las cepas con una producción excesiva de GDP1, está claro que TMB3260 (2 copias de *XYL1*), TMB3271 (2 copias de *XYL1* (K270M)) y CBP.CR5 (Δ *gdh1* GS-GOGAT), tenían velocidades de consumo de xilosa comparativamente altas (Tabla 5). Las cepas CBP.CR5 (Δ *gdh1* GS-GOGAT) y TMB3271 (2 copias de *XYL1* (K270M)) también tenían rendimientos de etanol elevados en comparación con TMB3001. Los resultados del diseño metabólico de los diferentes estudios demuestran cuán difícil es aumentar el rendimiento de etanol interfiriendo en el metabolismo redox, y suscita la cuestión del límite de flexibilidad de las rutas metabólicas centrales en *S. cerevisiae*.

Leyenda de la figura

Figura 1. Flujos en la ruta de la xilosa ($\text{mmol} \cdot \text{g biomasa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) para TMB3001 (valor superior, no negrita), TMB3270 (valor inferior, no negrita), TMB3260 (valor superior, negrita) y TMB3271 (valor inferior, negrita) cultivadas en un cultivo continuo con 10 g l^{-1} de glucosa y 10 g l^{-1} de xilosa. La absorción de azúcar (glucosa + xilosa) se normalizó a $100 \text{ mmoles} \cdot \text{g biomasa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Referencias

1. Eliasson, A., C. Christensson, C. F. Wahlbom, and B. Hahn-Hägerdal. 2000. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3381-3386.
2. Jeppsson, M., K. Träff, B. Johansson, B. Hahn-Hägerdal, and M.-F. Gorwa-Grauslund. 2003. Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 3:167-175.
3. Träff-Bjerre, K. L., M. Jeppsson, B. Hahn-Hägerdal, and M.-F. Gorwa-Grauslund. 2004. Endogeneous NADPH-dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21:141-150.
4. Jeppsson, M., B. Johansson, B. Hahn-Hägerdal, and M. Gorwa-Grauslund. 2002. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1604-1609.
5. Jeppsson, M., B. Johansson, P. Ruhdal-Jensen, B. Hahn-Hägerdal, and M. Gorwa-Grauslund. 2003. The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast* 20:1263-1272.
6. Zhang, Y., and H. Lee. 1997. Site-directed mutagenesis of the cysteine residues in the *Pichia stipitis* xylose reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* 147:227-232.
7. Roca, C., J. Nielsen, and L. Olsson. 2003. Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4732-4736.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza xilosa que fermenta xilosa a etanol donde la cepa
5 expresa

a) dos copias de un gen *XYL1* de *P. stipitis* mutado K270M,

b) el gen *XYL2* de *P. stipitis* nativo y

10 c) expresa en exceso el gen *XKS1* endógeno de *Saccharomyces cerevisiae*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

