

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 182**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2016 PCT/FR2016/050987**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2016 E 16722317 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2022 EP 3289068**

54 Título: **Cepa de levadura que muestra una capacidad mejorada para fermentar xilosa en presencia de ácido acético**

30 Prioridad:

27.04.2015 FR 1553760

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

24.03.2023

73 Titular/es:

**LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)
41, rue Etienne Marcel
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BAVOUZET, JEAN-MICHEL;
DESFOUGERES, THOMAS;
PIGNEDE, GEORGES y
TECHEL, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 937 182 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

Cepa de levadura que muestra una capacidad mejorada para fermentar xilosa en presencia de ácido acético

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a cepas de levadura capaces de fermentar pentosas, especialmente xilosa, incluso en presencia de inhibidores de esta fermentación como el ácido acético en forma no disociada.

10 De forma más precisa, la presente invención proporciona un método para seleccionar cepas mejoradas, muy eficaces en cuanto a su capacidad para metabolizar este tipo de azúcares presentes en los hidrolizados lignocelulósicos.

Estado de la técnica

15 La biomasa lignocelulósica o vegetal, proveniente principalmente de la actividad agrícola y agroindustrial, es un sustrato complejo, formado por tres fracciones principales que son la celulosa, las hemicelulosas y la lignina. Se trata de un residuo potencialmente reciclable, útil para la producción de etanol, cuya demanda, por ejemplo, para su uso como biocombustible, está en constante crecimiento.

20 El método de producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica consiste en recuperar por hidrólisis la máxima cantidad de azúcares presentes en las fracciones celulósica y hemicelulósica para después transformarlos en etanol por fermentación.

25 En cuanto a la fermentación de los azúcares presentes en esta biomasa, que comprende tanto azúcares C6 (hexosas) como azúcares C5 (pentosas), ahora se favorece la fermentación anaerobia por las levaduras, en particular con la ayuda de *Saccharomyces cerevisiae* cuya capacidad para fermentar la glucosa está ampliamente dominada y aprovechada.

30 Sin embargo, toda la atención se ha centrado en la fermentación de las pentosas, especialmente la xilosa, que pueden representar hasta un 25 a 40 % de los azúcares totales contenidos en la biomasa lignocelulósica. De este modo, se han modificado cepas de levadura capaces de fermentar glucosa para que también puedan metabolizar pentosas.

35 Como ejemplo, en el documento WO 2010/000464 se informa sobre la obtención de cepas de levadura capaces de fermentar pentosas gracias a un gen bacteriano que codifica una xilosa isomerasa (XI) que convierte la xilosa en xilulosa metabolizable por la levadura.

Debe tenerse en cuenta que, de manera alternativa, una vía eucariota, que comprende una xilosa reductasa (XR o *XYL1*) que genera xilitol y una xilitol deshidrogenasa (XDH o *XYL2*) también permite obtener xilulosa.

40 De este modo, en el documento WO 2012/072793 se describen cepas de levadura mejoradas, asociando genes exógenos que codifican una xilosa isomerasa y una xilitol deshidrogenasa para eliminar el xilitol, que es un inhibidor de la xilosa isomerasa. Dichas cepas, en particular, la cepa depositada en la CNCM el 5.10.2011 con el número I-4538, presentan rendimientos mejorados y, por tanto, una utilidad industrial comprobada para la producción de etanol.

45 En el documento US 2011/159560 se describe la posibilidad de introducir copias supernumerarias del gen *GAL2* en una cepa de levadura capaz de metabolizar xilosa.

50 Otra cuestión crucial ha sido la identificación, en hidrolizados lignocelulósicos, de inhibidores de la fermentación, entre los que figuran los furaldehídos (furfural, HMF), compuestos fenólicos y ácidos orgánicos (ácido acético, ácido levulínico, ácido fórmico). En particular, la presencia de una alta concentración de ácido acético, superior a 5 g/kg (de medio inicial) y pudiendo llegar hasta 10 g/kg, está intrínsecamente relacionada con la de los grupos acetilo asociados de manera covalente con las moléculas de hemicelulosa.

55 Trabajos anteriores han abordado la mejora de la resistencia de las cepas con respecto a la presencia de ácido acético en los mostos de fermentación. De este modo, en el documento WO 2011/080411 se comunica la obtención de cepas de levadura cuya resistencia al ácido acético sobre la glucosa ha sido mejorada.

60 Sin embargo, el ácido acético también es un inhibidor de la fermentación de xilosa. Esta inhibición se caracteriza por una reducción de la cinética de consumo de xilosa (Bellisimi *et al.*, FEMS Yeast Res., 2009. 9: 358-364), mientras que sobre la glucosa, esta inhibición se traduce en un retraso durante el inicio de la fermentación, permaneciendo invariable la cinética a partir de entonces. Debe tenerse en cuenta que, en presencia de glucosa y xilosa en el medio, las cepas de levadura fermentan prioritariamente la glucosa debido a la represión catabólica.

65 De este modo, en los documentos WO 2013/178915 y WO 2013/178918 se describen métodos de obtención de cepas de levadura capaces de metabolizar pentosas, en particular xilosa, y resistentes a inhibidores de la fermentación, en particular, ácido acético.

Sin embargo, existe una necesidad evidente de obtener nuevas cepas de levadura capaces de fermentar hexosas y pentosas, con un impacto incluso reducido de los inhibidores de la fermentación, en particular, del ácido acético, en particular, sobre la cinética de fermentación de pentosas tales como xilosa.

5

Descripción de la invención

La presente invención se basa en la demostración por parte de los inventores de la posibilidad de aislar nuevas cepas de levadura que muestran una resistencia con respecto a inhibidores de la fermentación, en particular, del ácido acético, no solo a nivel de su metabolismo de glucosa sino también a nivel de la fermentación de pentosas, especialmente xilosa.

10

De este modo y en el contexto de la invención, se ha desarrollado un método de selección de cepas de levadura que muestran una fermentación mejorada de pentosas, en particular, de xilosa, en presencia de inhibidores de la fermentación de tipo ácido orgánico, en particular, ácido acético. Utilizando dicho método, ha sido posible aislar cepas que muestran una cinética de fermentación de xilosa mejorada, en términos de velocidad de consumo de xilosa, incluso en presencia de altos niveles de ácido acético.

15

Cabe señalar que, en trabajos anteriores, ya se ha abordado esta cuestión:

20

De este modo, en el documento (Wright *et al.*, FEMS Yeast Res., 2011. 11: 299-306) se hace referencia a la mejora de la resistencia de cepas con respecto al acetato sobre xilosa. Este trabajo tiende a mostrar que el fenómeno de resistencia con respecto al ácido acético sobre xilosa podría ser un proceso inducible. Además, los resultados presentados parecen ser muy contradictorios:

25

Los cultivos seleccionados por el método SBR (por las siglas del inglés "*Single Batch Repeat*", repetición de un solo lote) o con un quimostato limitado en xilosa, demuestran solo una ligera disminución en la concentración final de xilosa y, por consiguiente, un ligero aumento en la concentración de etanol durante los primeros 3 días, en comparación con los resultados de la cepa inicial.

30

Asimismo, el pico de la tasa de consumo específico de xilosa en función de la concentración de ácido acético culmina en un valor muy cercano al observado para la cepa inicial, es decir, 2,5 g/l.

Además, se observa que con la cepa aislada, la velocidad de consumo específico de xilosa disminuye después de manera comparable a lo que se observa con la cepa inicial. Según las conclusiones obtenidas, estos resultados indicarían que una selección prolongada en cultivo SBR no puede conducir a un fenotipo estable de tolerancia al ácido acético.

35

En otro documento (Sanda *et al.*, Bioresource Technology, 2011.102:7917-7924) se comunicó la implementación de una evolución dirigida en un hidrolizado lignocelulósico que contiene glucosa y xilosa. Sin embargo, la técnica SBR, que permite seleccionar cepas que se multiplican más rápido, ha conducido a seleccionar cepas que crecen más rápido en glucosa.

40

A pesar de los fracasos de la técnica anterior, los inventores han desarrollado un nuevo método de selección que permite producir cepas de levadura que muestran las características esperadas en términos de fermentación de xilosa en presencia de ácido acético.

45

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de selección de una cepa de levadura que muestra una capacidad mejorada para fermentar una pentosa en presencia de ácido orgánico en forma no disociada,

50

en el que al menos una cepa de levadura que muestra una capacidad para fermentar dicha pentosa, se cultiva sucesivamente en los 2 medios siguientes:

- un primer medio de crecimiento que comprende como única fuente de carbono dicha pentosa y dicho ácido orgánico en forma no disociada;
- un segundo medio de crecimiento que comprende como única fuente de carbono otra fuente de carbono, ventajosamente glucosa, y que carece de dicho ácido orgánico en forma no disociada,

55

repetiéndose al menos dos veces el cultivo sucesivo en al menos estos dos medios de crecimiento, en presencia de concentraciones crecientes de ácido orgánico en forma no disociada a una concentración comprendida entre 1,3 y 2,6 g/l.

60

De este modo, el procedimiento según la invención permite, a partir de una cepa aislada o de una mezcla de cepas, seleccionar una cepa que muestre una ventaja selectiva en términos de crecimiento en un medio que contiene dicha pentosa y dicho ácido orgánico en forma no disociada.

65

El procedimiento, objeto de la presente solicitud, puede implementarse en una cepa aislada, en particular en las

siguientes cepas:

- la cepa depositada en la CNCM el 16.05.2013 con el número I-4749;
- la cepa depositada en la CNCM el 12.12.2013 con el número I-4829;
- 5 - la cepa depositada en la CNCM el 9.04.2015 con el número I-4966.

En este caso y sin querer vincularse a ninguna teoría, la presión de selección ejercida por los sucesivos cultivos en los medios de crecimiento definidos a continuación, permite que la cepa adquiera los rasgos fenotípicos necesarios para aumentar su capacidad de fermentar una pentosa en presencia de ácido orgánico en forma no disociada.

10 Según otro aspecto, se trata de una mezcla de cepas de levadura que se somete al procedimiento según la invención. En tal caso, al menos una de las cepas soporta la presión de selección como se ha descrito anteriormente, para desarrollar una capacidad mejorada para fermentar una pentosa en presencia de ácido orgánico en forma no disociada. Alternativamente, la mezcla de cepas ya contiene una cepa que muestra una capacidad mejorada para
15 fermentar una pentosa en presencia de un ácido orgánico en forma no disociada y el procedimiento según la invención permite enriquecer la mezcla con esta cepa, debido a su multiplicación más rápida, y de este modo aislar o seleccionar dicha cepa.

20 Según un modo de realización particular, antes de su cultivo en los diversos medios de cultivo según la invención, la cepa de levadura o la mezcla de cepas, se somete a una etapa previa de mutagénesis que puede favorecer la aparición del fenotipo deseado. Convencionalmente, esta mutagénesis puede llevarse a cabo por exposición a un agente químico o a radiación, especialmente ultravioleta (UV). Ventajosamente se eligen condiciones "suaves", por ejemplo, una exposición de 100 a 500 J/cm², por ejemplo, 300 J/cm², de radiación UV a 254 nm.

25 Según el procedimiento de la invención, la cepa de levadura o la mezcla de cepas se cultiva sucesivamente en al menos dos medios de crecimiento. En el contexto de la presente solicitud, las expresiones "medio de crecimiento" o "medio de cultivo" se utilizan indistintamente para designar un medio que comprende los ingredientes necesarios para la supervivencia o incluso la multiplicación de las levaduras presentes.

30 El primer medio de crecimiento se caracteriza por que comprende, como única fuente de carbono, pentosa, cuya capacidad de fermentación se busca mejorar. Se trata ventajosamente de xilosa o de arabinosa, incluso más ventajosamente de xilosa. De manera ventajosa, este primer medio es un medio líquido.

35 De manera ventajosa, la concentración de pentosa del medio de crecimiento es la que se emplea comúnmente cuando se utiliza como única fuente de carbono, es decir, la comprendida entre 5 y 100 g/l en el caso de un medio líquido (5 y 100 g/kg en el caso de un medio sólido), ventajosamente comprendida entre 25 y 90 g/l, por ejemplo igual a 50 g/l. Según un modo de realización particular, el medio de crecimiento contiene 50 g/l de xilosa.

40 Dicho medio también comprende el ácido orgánico que puede inhibir la fermentación de dicha pentosa. Se trata ventajosamente de ácido acético o de ácido fórmico, incluso más ventajosamente de ácido acético.

45 Debe tenerse en cuenta que, como se sabe, solo la forma no disociada o no ionizada de dichos ácidos presenta capacidad inhibitoria. En el contexto de la invención, por "forma no ionizada o no disociada" de un ácido carboxílico se entiende que es su forma protonada. En la práctica, la forma de dichos ácidos orgánicos depende del pH del medio en el que se incorporan. A un pH superior al pKa del ácido, este se encuentra principalmente en forma disociada o de iones COO⁻. Por el contrario y a un pH inferior, la forma mayoritaria es la forma no disociada o no ionizada (COOH). En el resto de la invención, se especificará, en particular en relación con las cantidades o concentraciones, si sólo se tiene en cuenta la forma no disociada del ácido orgánico presente, o si se hace referencia al ácido acético introducido en el medio, englobando formas disociadas y no disociadas en función del pH de dicho medio.

50 Según la invención, la concentración de ácido orgánico en forma no disociada, ventajosamente de ácido acético, del medio de crecimiento está comprendida entre 1,3 y 2,6 g/l en medio líquido (equivalente a 1,3 y 2,6 g/kg en medio sólido). En la práctica y como ejemplo, este último intervalo corresponde a una concentración de ácido acético añadida a un medio de crecimiento a pH 5 comprendida entre 3 y 6 g/l.

55 Según la invención, este primer medio de crecimiento se emplea en un ciclo de crecimiento en al menos dos, o incluso tres medios, repitiéndose dicho ciclo al menos dos veces. Convenientemente, de acuerdo con la invención, durante al menos 2 ciclos de crecimiento, aumenta la concentración de ácido orgánico en forma no disociada.

60 En otras palabras, el cultivo sucesivo en al menos los dos medios de crecimiento definidos en el contexto de la invención, se repite al menos dos veces, en presencia de concentraciones crecientes de ácido orgánico, ventajosamente ácido acético, en forma no disociada. De este modo y en presencia de n ciclos (siendo n mayor o igual a 2), se implementan al menos dos concentraciones, siendo la primera concentración inferior a la segunda concentración.

65 Como ejemplo, y durante 8 ciclos de cultivo en presencia de ácido acético, un esquema de aumento de la

concentración en el primer medio de crecimiento puede ser el siguiente:

- 1^{er} ciclo: concentración de ácido acético añadida en un medio a pH 5 igual a 3 g/l (es decir, 1,3 g/l de ácido acético en forma disociada);
- 5 - 2^o ciclo: concentración de ácido acético añadida en un medio a pH 5 igual a 3 g/l (es decir, 1,3 g/l de ácido acético en forma no disociada);
- 3^{er} ciclo: concentración de ácido acético añadida en un medio a pH 5 igual a 3 g/l (es decir, 1,3 g/l de ácido acético en forma no disociada);
- 10 - 4^o ciclo: concentración de ácido acético añadida en un medio a pH 5 igual a 4 g/l (es decir, 1,7 g/l de ácido acético en forma no disociada);
- 5^o ciclo: concentración de ácido acético añadida en un medio a pH 5 igual a 4 g/l (es decir, 1,7 g/l de ácido acético en forma no disociada);
- 6^o ciclo: concentración de ácido acético añadida en un medio a pH 5 igual a 4 g/l (es decir, 1,7 g/l de ácido acético en forma no disociada);
- 15 - 7^o ciclo: concentración de ácido acético añadida en un medio a pH 5 igual a 5 g/l (es decir, 2,15 g/l de ácido acético en forma no disociada);
- 8^o ciclo: concentración de ácido acético añadida en un medio a pH 5 igual a 6 g/l (es decir, 2,6 g/l de ácido acético en forma no disociada).

20 Además de estos dos ingredientes, este medio de crecimiento es ventajosamente un medio sintético completo, adecuado para el crecimiento de levaduras y puede contener ingredientes convencionales como sales, agentes tampón, extracto de levadura o cualquier otra fuente de nitrógeno metabolizable por la levadura, vitaminas.... En el contexto de la invención, por "medio sintético" se entiende que es un medio cuya composición química se conoce.

25 Según un modo de realización particular, además de pentosa como única fuente de carbono y ácido orgánico, un medio de este tipo puede comprender:

- extracto de levadura (EXL), ventajosamente de hasta 5 g/l;
- fosfato diamónico, ventajosamente de hasta 4,7 g/l;
- 30 - ácido cítrico, ventajosamente de hasta 11,4 g/l;
- citrato trisódico, ventajosamente de hasta 13,5 g/l;
- ZnSO₄, ventajosamente de hasta 21,2 mg/l;
- MgSO₄ 7H₂O, ventajosamente de hasta 1 g/l;
- 35 - Tiamina, ventajosamente de hasta 18,24 mg/l;
- Piridoxina, ventajosamente de hasta 5,28 mg/l;
- Biotina, ventajosamente de hasta 1,76 g/l;
- Pantotenato, ventajosamente de hasta 3,8 mg/l;
- ácido nicotínico, ventajosamente de hasta 20 mg/l;
- mioinositol, ventajosamente de hasta 50 mg/l;
- 40 - riboflavina, ventajosamente de hasta 1 mg/l;
- para-amino-benzoato, ventajosamente de hasta 1,2 mg/l;
- Tween 80, ventajosamente de hasta 1 g/l.

45 Además de la composición específica de este primer medio de crecimiento, el cultivo de la cepa de levadura o de la mezcla de cepas se realiza ventajosamente en condiciones estándar favorables al crecimiento de las levaduras, en particular del tipo *Saccharomyces*, y su actividad fermentativa, es decir:

- un pH ácido, ventajosamente comprendido entre 4 y 6, incluso 4,5 y 5,5, incluso más ventajosamente igual a 5;
- una temperatura comprendida entre 28 y 37 °C, incluso entre 30 y 35 °C, ventajosamente igual a 32 °C;
- 50 - con agitación suave, por ejemplo, igual a 100 rpm;
- en condiciones reducidas de suministro de oxígeno (con O₂ limitado). En la práctica, el cultivo puede realizarse en un matraz sellado con un tapón que reduce el suministro de O₂ en el medio ambiente permitiendo la evacuación de producto CO₂.

55 De manera general, el cultivo se detiene cuando la fuente de carbono osídico, en este caso pentosa, se ha consumido por completo. En la práctica, y de manera ventajosa, el cultivo se lleva a cabo durante al menos 24 horas, incluso varios días, ventajosamente 7 días.

60 La segunda etapa del procedimiento según la invención consiste en transferir las levaduras cultivadas en el primer medio de crecimiento a un segundo medio de crecimiento, ventajosamente líquido. De manera característica, este se diferencia del primer medio de cultivo por la presencia de una fuente de carbono diferente y por la ausencia del ácido orgánico, ventajosamente ácido acético, en forma no disociada.

65 En la práctica, este medio es favorable al crecimiento de las levaduras y permite eliminar los fenómenos de adaptación, en beneficio de la adquisición de mutaciones estables. De este modo, esta etapa del procedimiento según la invención se considera como una fase de desadaptación.

Este segundo medio de crecimiento se caracteriza por que comprende, como única fuente de carbono, una fuente de carbono diferente de la del primer medio de cultivo, es decir, una pentosa, especialmente xilosa. Según un modo de realización particular, la fuente de carbono del segundo medio de cultivo es una fuente de carbono osídico, ventajosamente una hexosa, aún más ventajosamente glucosa. De manera ventajosa, la concentración de esta segunda fuente de carbono, ventajosamente en glucosa, está comprendida entre 5 y 50 g/l, ventajosamente comprendida entre 5 y 20 g/l, por ejemplo, es igual a 20 g/l.

Asimismo y de manera ventajosa, se trata es un medio rico de crecimiento sintético, que comprende, por ejemplo:

- extracto de levadura, ventajosamente de hasta 10 g/l;
- peptona, ventajosamente de hasta 10 g/l.

De manera ventajosa, se trata por tanto de un medio rico que permite que todas las cepas de levadura se multipliquen sin ninguna limitación que estaría relacionada con cualquier auxotrofia.

Además de la composición específica de este segundo medio de crecimiento, el cultivo de la cepa de levadura o de la mezcla de cepas se realiza ventajosamente en condiciones estándar favorables al crecimiento de las levaduras, es decir:

- un pH ácido y estable, ventajosamente comprendido entre 4 y 6, por ejemplo igual a 5;
- una temperatura comprendida entre 28 y 37 °C, incluso entre 30 y 35 °C, ventajosamente igual a 30 °C;
- con agitación media, por ejemplo, igual a 150 rpm;
- en presencia de oxígeno, es decir, en aerobiosis. En la práctica, el cultivo puede realizarse en un matraz con deflectores, sellado con un tapón poroso, que permite el suministro de O₂ en el medio y la evacuación del producto CO₂.

En este caso también, el cultivo se detiene cuando la fuente de carbono osídico, ventajosamente la glucosa, se ha consumido por completo. Cabe señalar que, en la práctica, en este segundo medio, debido a la aerobiosis, el crecimiento es más rápido que en el primer medio, a la glucosa como fuente de carbono y a la ausencia de ácido acético. De este modo y de manera ventajosa, el cultivo se lleva a cabo durante varias horas, ventajosamente durante 24 horas.

Según la invención, el cultivo de las levaduras sucesivamente en los dos medios de crecimiento y en las condiciones descritas anteriormente, constituye un ciclo.

Según un modo de realización particular, un ciclo en el procedimiento según la invención, comprende además el paso de las levaduras en un tercer medio de crecimiento, ventajosamente líquido, diseñado para seleccionar células que pueden respirar, es decir, que presentan mitocondrias funcionales. En la práctica, esta etapa, que puede emplearse en cada ciclo o al menos una vez en el proceso, permite liberarse de la aparición de "petites", cuyo fenotipo deficiente respiratorio puede ser desventajoso en el contexto de los procesos de producción de levaduras industriales.

De manera ventajosa, este tercer medio es un medio pobre o mínimo, que contiene, como única fuente de carbono, una fuente de carbono que solo la pueden utilizar las células que han conservado mitocondrias funcionales. En este caso, se habla de fuente de carbono estrictamente respiratoria, es decir, de una fuente de carbono que implica sistemáticamente una oxidación mitocondrial y que no produce etanol. Ventajosamente, puede tratarse de glicerol, u opcionalmente, de etanol. En otras palabras, dicho medio carece de azúcar fermentable. Ventajosamente, la concentración de glicerol del medio de crecimiento es la que se emplea comúnmente cuando se utiliza como única fuente de carbono, es decir, entre 5 y 50 g/l, ventajosamente comprendida entre 10 y 50 g/l, por ejemplo, igual a 10 g/l, para obtener una biomasa suficiente para inocular el primer medio de cultivo del siguiente ciclo.

Por definición, un medio mínimo contiene, además de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de potasio, una fuente de fósforo, una fuente de azufre, una fuente de magnesio, una fuente de calcio, una fuente de hierro, una fuente de oligoelementos y agua.

Un medio que puede servir para la preparación de este tercer medio de cultivo puede comprender:

- una base, tal como una "base de nitrógeno de levadura" de DIFCO®, ventajosamente de hasta 3,4 g/l;
- y opcionalmente sulfato de amonio, ventajosamente de hasta 5 g/l.

Además de la composición específica de este tercer medio de crecimiento, el cultivo de la cepa de levadura o de la mezcla de cepas se realiza ventajosamente en condiciones estándar favorables al crecimiento de las levaduras, es decir:

- un pH ácido, ventajosamente comprendido entre 4 y 6, incluso 4,5 y 5,5, por ejemplo igual a 5;
- una temperatura comprendida entre 28 y 37 °C, incluso entre 30 y 35 °C, ventajosamente igual a 30 °C;

- con agitación media, por ejemplo, igual a 150 rpm;
- en aerobiosis. En la práctica, el cultivo puede realizarse en un matraz con deflectores sellado con un tapón poroso que permite el suministro de O₂ en el medio.

5 En este caso también, el cultivo se detiene cuando la fuente de carbono, ventajosamente glicerol, se ha consumido por completo. Cabe señalar que, en la práctica, el crecimiento en este medio es *a priori* más lento que en el segundo medio debido a la fuente de nitrógeno mineral. De este modo y de manera ventajosa, el cultivo se lleva a cabo durante varias horas, ventajosamente durante 48 horas.

10 Como ya se mencionó, el procedimiento según la invención se caracteriza por que el cultivo de la cepa de levadura, sucesivamente en los dos o tres medios de crecimiento descritos anteriormente, se repite en forma de ciclos.

El número de ciclo se elige de modo que se favorezca la selección de la cepa que muestre la característica deseada, es decir, una capacidad mejorada para fermentar una pentosa en presencia de un ácido orgánico inhibidor, limitando el número de ciclos para evitar la aparición de defectos en las levaduras.

15 De este modo y de manera ventajosa, el número de ciclos es al menos igual a dos y ventajosamente inferior o igual a 10, por ejemplo igual a 8. En otras palabras, el cultivo sucesivo en al menos los dos medios de crecimiento definidos se repite al menos dos veces, ventajosamente más de 2 veces pero menos de 10 veces, por ejemplo 8 veces.

20 Según otro modo de realización ventajoso del procedimiento según la invención, el cultivo sucesivo en al menos los dos medios de crecimiento se repite al menos dos veces, en presencia de concentraciones crecientes de ácido orgánico, ventajosamente ácido acético, en forma no disociada. En otras palabras, el procedimiento según la invención se realiza en presencia de al menos dos concentraciones distintas, siendo la primera concentración inferior a la segunda. El aumento de esta concentración se puede hacer gradualmente, opcionalmente por fases. De este modo y de manera ventajosa, para la adaptación de cepas de levadura, al menos los dos primeros ciclos se realizan a concentración constante.

30 Según la invención, la concentración de ácido orgánico del primer medio de crecimiento, ventajosamente de ácido acético, en forma no disociada, está comprendida entre 1,3 y 2,6 g/l.

35 Cuando se alcanza el número de ciclos deseado y para obtener clones diferenciados, el cultivo se extiende ventajosamente en un medio sólido, incluso más ventajosamente en un medio sintético favorable al crecimiento de las levaduras, tal como el medio YPG (*Yeast Peptone Glucose*, por sus siglas en inglés, Levadura Peptona Glucosa). El nivel de siembra suele ser de 2000 células por placa y el crecimiento tiene lugar a 30 °C durante aproximadamente 72 horas.

En un modo de realización particular, se analizan los rendimientos de los clones aislados de este modo.

40 Con este fin, pueden realizarse precultivos en medio líquido, ventajosamente en un medio sintético favorable al crecimiento de las levaduras, tal como el medio YPG.

45 De manera ventajosa, estos precultivos sirven para la siembra de un medio de selección, es decir, un medio equivalente al primer medio de crecimiento descrito anteriormente, que comprende como única fuente de carbono dicha pentosa, ventajosamente xilosa, y dicho ácido orgánico, ventajosamente ácido acético, en forma no disociada. De manera preferida, se elige una concentración media de ácido acético, por ejemplo, igual a 5 g/l para un medio a pH 5.

50 De manera ventajosa, los clones seleccionados son los que muestran el mejor crecimiento en este medio. El nivel de crecimiento puede determinarse analizando la turbidez, midiendo la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda comprendida entre 600 y 700 nm, por ejemplo, igual a 630 nm. En la práctica, el crecimiento puede evaluarse en microplacas tipo DeepWeel o en medio líquido en las condiciones que se indican a continuación, es decir:

- un pH ácido, ventajosamente comprendido entre 4 y 6, incluso 4,5 y 5,5, incluso más ventajosamente igual a 5;
- una temperatura comprendida entre 28 y 37 °C, incluso entre 30 y 35 °C, ventajosamente igual a 32 °C;
- con agitación suave, por ejemplo, igual a 100 rpm, o sin agitación;
- en condiciones reducidas de suministro de oxígeno (bajo O₂ limitado o condiciones anaerobias);
- un tiempo de crecimiento de al menos 24 horas, por ejemplo, de 72 horas.

60 La tasa de siembra debe ser moderada para impedir que se produzca un efecto de "titulación" de las levaduras, por ejemplo igual a 0,25 g/kg eq MS (MS = materia seca).

65 Por lo tanto, un primer criterio importante es la capacidad de la(s) cepa(s) de levadura seleccionada(s) para crecer en un medio que contenga una pentosa como única fuente de carbono, especialmente xilosa, en presencia de un inhibidor de tipo ácido orgánico en forma no disociada, en particular, ácido acético.

5 Según otro modo de realización, el procedimiento de selección puede comprender una etapa de evaluación de la pérdida de masa en función del tiempo de fermentación en el medio de selección y en las condiciones definidas anteriormente. La medida de la pérdida de masa del matraz de fermentación se correlaciona con la producción de alcohol. El seguimiento de esta pérdida de masa refleja, por tanto, la cinética de fermentación de la pentosa, ventajosamente xilosa, en presencia de un inhibidor de tipo ácido orgánico en forma no disociada, en particular, ácido acético.

10 En estas condiciones y en presencia de solo pentosa como fuente de carbono (sin glucosa), el perfil esperado es monofásico, con una cinética asociada de tipo $ax + b$ cuando el azúcar se encuentra en una concentración no limitante (al inicio del cultivo). En el contexto de la selección de una cepa ventajosa, en particular en su velocidad de fermentación de pentosas, en particular, de xilosa, el valor a (número positivo) es lo más alto posible.

15 Asimismo, se busca una cepa de levadura capaz de resistir al ácido acético en medio de xilosa, incluso a altas concentraciones de ácido acético. De este modo, puede medirse la velocidad de producción máxima de CO_2 durante la fermentación de xilosa en un medio como el descrito anteriormente pero que contiene concentraciones variables de ácido acético del medio de fermentación.

20 Para una concentración dada de ácido acético, se prefiere que la cepa seleccionada tenga una velocidad máxima de consumo de xilosa, igual al doble de la pérdida de masa en fermentación, mayor que la de las cepas ya aisladas, independientemente de la concentración de ácido acético (incluso en ausencia de ácido acético), ventajosamente en el intervalo de concentraciones de medios reales, por ejemplo entre 4 y 8 g/kg.

25 Asimismo y según otro modo de realización ventajoso, se comprueba que la capacidad de la cepa seleccionada para fermentar la glucosa (hexosa) y la xilosa (pentosa) en presencia del ácido orgánico en forma no disociada, ventajosamente ácido acético, no se ve afectada. Se trata por tanto de analizar las características de la fermentación en general, en un medio semejante a los medios reales que contienen tanto hexosas como pentosas.

30 En la práctica, la fermentación se realiza en un medio rico del tipo YFP, que contiene glucosa, xilosa y ácido acético, por ejemplo, un medio que comprende:

- extracto de levadura, ventajosamente de hasta 10 g/l;
- bacto-peptona, ventajosamente de hasta 10 g/l;
- glucosa, ventajosamente de hasta 55 g/l;
- 35 - xilosa, ventajosamente de hasta 45 g/l;
- ácido acético, ventajosamente con una cantidad introducida en el medio de hasta 5 g/l;
- KOH.

40 Las condiciones de cultivo son las que están adaptadas al crecimiento y a la fermentación de las levaduras, ventajosamente:

- un pH ácido, ventajosamente comprendido entre 4 y 6, incluso más ventajosamente igual a 5;
- una temperatura comprendida entre 28 y 37 °C, incluso entre 30 y 35 °C, ventajosamente igual a 32 °C;
- con agitación suave, por ejemplo, igual a 100 rpm;
- 45 - en condiciones reducidas de suministro de oxígeno (bajo O_2 limitado o condiciones anaerobias);
- con un tiempo de crecimiento de al menos 24 horas, por ejemplo, de 72 horas.

50 La tasa de siembra debe ser moderada para impedir que se produzca un efecto de "titulación" de las levaduras, por ejemplo igual a 0,25 g/kg eq MS (MS = materia seca).

Se espera un perfil que ilustre el doble efecto del ácido acético sobre la levaduras capaces de fermentar la xilosa y la glucosa:

- Durante la primera fase, denominada "fase de glucosa", un retraso en el inicio de la fermentación lo más reducido posible, ventajosamente inferior a 24 horas, incluso más ventajosamente del orden de 5 a 6 horas. De manera preferida, la cepa seleccionada no ha perdido por tanto la resistencia con respecto al ácido acético durante la fermentación de la glucosa;
- Durante la fermentación de la xilosa, una cinética lo más favorable posible, es decir, lo más rápido y lo más sustancioso posible, con mejores rendimientos que las cepas de la técnica anterior.

60 Según un modo de realización ventajoso, el procedimiento según la invención se emplea en una cepa de levadura que muestra propiedades interesantes en el contexto de la aplicación prevista:

- un buen crecimiento en medios sintéticos y naturales;
- 65 - una capacidad para fermentar la glucosa, que incluye, de manera ventajosa, en presencia de un ácido orgánico en forma no disociada, en particular ácido acético;

- una capacidad para fermentar xilosa, que incluye, de manera ventajosa, en presencia de un ácido orgánico en forma no disociada, en particular ácido acético;
- y ventajosamente una inhibición reducida de la vía de fermentación de glucosa por ácido acético.

5 Dichas cepas se eligen, por ejemplo, del siguiente grupo:

- cepa depositada en la CNCM el 5.10.2011 con el número 1-4538;
- cepa depositada en la CNCM el 16.05.2013 con el número I-4749;
- cepa depositada en la CNCM el 12.12.2013 con el número I-4829;
- 10 - cepa depositada en la CNCM el 9.04.2015 con el número I-4966.

Las cepas preferidas son la cepa depositada en la CNCM el 12.12.2013 con el número I-4829 y/o la cepa depositada en la CNCM el 9.04.2015 con el número I-4966.

15 Preferentemente, las cepas seleccionadas al final del procedimiento según la invención, conservan las características de interés de las cepas utilizadas para la puesta en práctica de dicho procedimiento.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de levadura obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente, es decir, la cepa depositada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) con el número I-4953 el 29 de enero de 2015.

20 Sorprendentemente, dicha cepa tiene una capacidad sin precedentes para fermentar xilosa en presencia de ácido acético.

25 Esta capacidad se mide ventajosamente en las siguientes condiciones:
Se realiza un precultivo de la cepa en medio líquido, ventajosamente en un medio sintético favorable al crecimiento de levaduras, tal como el medio YPG, y en las condiciones descritas en relación con el segundo medio empleado en el procedimiento descrito anteriormente.

30 Después de 24 a 72 horas de cultivo a 30 °C, la cepa se transfiere a un medio de crecimiento tal como el primer medio de crecimiento del procedimiento según la invención. Dicho medio se define ventajosamente de la siguiente manera:

- extracto de levadura (EXL), ventajosamente de hasta 5 g/l;
- fosfato diamónico, ventajosamente de hasta 4,7 g/l;
- 35 - ácido cítrico, ventajosamente de hasta 11,4 g/l;
- citrato trisódico, ventajosamente de hasta 13,5 g/l;
- ZnSO₄, ventajosamente de hasta 21,2 mg/l;
- MgSO₄ 7H₂O, ventajosamente de hasta 1 g/l;
- Tiamina, ventajosamente de hasta 18,24 mg/l;
- 40 - Piridoxina, ventajosamente de hasta 5,28 mg/l;
- Biotina, ventajosamente de hasta 1,76 g/l;
- Pantotenato, ventajosamente de hasta 3,8 mg/l;
- ácido nicotínico, ventajosamente de hasta 20 mg/l;
- mioinositol, ventajosamente de hasta 50 mg/l;
- 45 - riboflavina, ventajosamente de hasta 1 mg/l;
- para-amino-benzoato, ventajosamente de hasta 1,2 mg/l;
- Tween 80, ventajosamente de hasta 1 g/l.

50 Además contiene xilosa como única fuente de carbono, a una concentración ventajosamente igual a 50 g/l y concentraciones variables de ácido acético comprendidas preferentemente entre 0 y 10 g/l para poder establecer una curva de efecto/dosis. Se trata de valores de cantidades de ácido acético introducidas en el medio de cultivo a pH 5.

Las condiciones de siembra y de cultivo son ventajosamente las siguientes:

- 55 - un pH ácido, ventajosamente comprendido entre 4 y 6, incluso 4,5 y 5,5, incluso más ventajosamente igual a 5;
- una temperatura comprendida entre 28 y 37 °C, incluso entre 30 y 35 °C, ventajosamente igual a 32 °C;
- con agitación suave, por ejemplo, igual a 100 rpm;
- en condiciones reducidas de suministro de oxígeno (bajo O₂ limitado o condiciones anaerobias);
- un tiempo de crecimiento de al menos 24 horas, ventajosamente de 72 horas;
- 60 - con una tasa de siembra ventajosamente igual a 0,25 g/kg eq MS (MS = materia seca).

Después de este cultivo, la velocidad máxima de producción de CO₂ se determina para cada concentración de ácido acético.

65 En estas condiciones, se ha comunicado por primera vez, la selección de cepas de levadura que muestran la siguiente característica, nunca obtenida por las cepas de la técnica anterior: La dosis de ácido acético necesaria para reducir

su cinética de consumo de xilosa en un 50 % es superior a 2,5 g/l en medio líquido (2,5 g/kg en medio sólido), incluso de 3 g/l, incluso superior o igual a 3,5 g/l, ventajosamente superior o igual a 4 g/l, e incluso superior o igual a 5 g/l. Se trata de valores de cantidades de ácido acético introducidas en el medio de cultivo a pH 5.

5 En la práctica, esto da como resultado una cinética de fermentación de xilosa más rápida en medios reales, que normalmente comprenden entre 2 y 8 g/kg de ácido acético. De este modo, y en presencia de una cepa según la invención, es posible contemplar una fermentación total de los azúcares presentes en menos de 72 horas, ventajosamente entre 48 y 72 horas.

10 La cepa de levadura objeto de la invención, comprende al menos una copia de un gen exógeno que codifica la xilosa isomerasa, ventajosamente de *Clostridium phytofermentans*. En el contexto de la invención, por "exógeno" se entiende que el gen procede de otro organismo.

15 La cepa de levadura objeto de la invención, comprende al menos una copia supernumeraria del gen *GAL2* que codifica un transportador de hexosas también capaz de garantizar la captura de xilosa. Según otro modo de realización, dicha cepa comprende al menos dos copias supernumerarias del gen *GAL2*. Este puede ponerse bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo de tipo *pADH1*.

20 La cepa de levadura objeto de la invención, muestra una o más características elegidas del siguiente grupo:

- supresión de la actividad aldosa reductasa (*GRE3*);
- sobreproducción de xilulocinasa (*XKS1*), en particular por modificación del promotor o introducción de copias supernumerarias;
- la expresión o sobreproducción de la vía de las pentosas fosfato (*RPE1*, *RK11*, *TKL1*, *TAL1*,...);
- 25 - la ausencia de actividad xilosa reductasa (*XR*);
- la capacidad de fermentar la arabinosa, ventajosamente gracias a la introducción de la vía bacteriana como se describe en los documentos WO 2008/041840 o EP 1 499 708.

30 La cepa de levadura objeto de la presente invención, pertenece al grupo de los hemiascomicetos, al género *Saccharomyces*. Se trata de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

35 En el contexto de la invención, por "cepa de levadura" se entiende una población de levaduras que es rigurosamente idéntica desde el punto de vista genético. Esto incluye tanto las denominadas cepas de laboratorio como las denominadas cepas industriales.

Según otro aspecto, la presente invención también se refiere a una levadura obtenida mediante el cultivo de una cepa como la definida anteriormente.

40 En el contexto de la invención, por "levadura" se entiende que es un producto comercial obtenido gracias al empleo de un procedimiento de producción de una cepa de levadura. De este modo, pueden obtenerse levaduras que muestren diferentes características a partir de una misma cepa, estando estas diferencias relacionadas con el procedimiento de producción empleado.

45 Según otro aspecto, la invención se refiere al uso de una cepa o de una levadura como la definida anteriormente para la fermentación de un material, que contienen ventajosamente xilosa y/o glucosa, y/o para la producción de etanol. Según un modo de realización particular, el material es un material lignocelulósico. Dicho material normalmente contiene:

- pentosas, en particular, D-xilosa y L-arabinosa;
- 50 - hexosas, en particular, D-manosa, D-galactosa, L-ramnosa y D-glucosa;
- ácidos urónicos.

55 Según un aspecto particular, la invención se refiere a un procedimiento de producción de productos de fermentación o de etanol que comprende las siguientes etapas:

- Incubación de un material o medio que contenga xilosa con una cepa o una levadura como la definida anteriormente;
- Fermentación en condiciones anaerobias o semi-anaerobias;
- Recuperación del (de los) producto(s) de fermentación o del etanol.

60 Según un modo realización particular de este procedimiento, el material o medio también contiene glucosa.

A continuación, la presente invención se ilustrará con ayuda de los siguientes ejemplos de realización, basándose en las figuras adjuntas. Sin embargo, estos no son de ninguna manera limitativos.

65

Leyendas de las figuras:

La figura 1 representa la evolución de la pérdida de masa (expresada en g/kg) en función del tiempo de fermentación de diferentes cepas, en un medio que contiene xilosa a 50 g/l y ácido acético a 5 g/l a pH=5.

5 La figura 2 representa el impacto de la concentración de ácido acético (expresada en g/l a pH 5) sobre la velocidad de pérdida de masa (producción de CO₂ a partir de xilosa), durante la fermentación de diferentes cepas, en un medio que contiene xilosa a 50 g/l.

La figura 3 representa la evolución de la pérdida de masa (expresada en g/kg) en función del tiempo de fermentación de diferentes cepas, en un medio que contiene glucosa a 55 g/l, xilosa a 45 g/l y ácido acético a 5 g/l (a pH 5).

10

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

I/ Material y Métodos:

15 1/ Cepa:

Levadura: *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa: I-4829 o I-4966

20 2/ Medios y condiciones de cultivo:

2-a/ Evolución dirigida:

Medio 1: YFX50 =

25

- xilosa 50 g/l;
- extracto de levadura (EXL) 5 g/l;
- fosfato diamónico 4,7 g/l;
- ácido cítrico 11,4 g/l;
- 30 - citrato trisódico 13,5 g/l;
- ZnSO₄ 21,2 mg/l;
- MgSO₄ 7H₂O 1 g/l;
- tiamina 18,24 mg/l;
- piridoxina 5,28 mg/l;
- 35 - biotina 1,76 g/l;
- pantotenato 3,8 mg/l;
- ácido nicotínico 20 mg/l;
- mioinositol 50 mg/l;
- riboflavina 1 mg/l;
- 40 - para-amino-benzoato 1,2 mg/l;
- tween 80 1 g/l.

Las levaduras se cultivan en este medio con xilosa como única fuente de carbono y ácido acético, cuya concentración aumenta durante los ciclos (véase el apartado Resultados).

45

El pH del medio se mantiene a 5.

El cultivo se realiza a 32 °C con agitación a 100 rpm en matraces sellados con tapones para reducir el suministro de oxígeno al medio y permitir la salida del CO₂ sobrepresurizado que se produce a lo largo del cultivo. En estas condiciones, el cultivo dura aproximadamente 7 días.

50

Medio 2 (YPG):

- 10 g/l de extracto de levadura;
- 55 - 10 g/l de peptona;
- 20 g/l de glucosa como única fuente de carbono.

El cultivo se realiza a 30 °C con agitación a 150 rpm en matraces con deflectores sellados con tapones porosos que permiten el suministro de oxígeno al medio. En estas condiciones, el cultivo dura aproximadamente 24 horas.

60

Medio 3:

- 3,4 g/l de "base nitrogenada de levadura" DIFCO®;
- 5 g/l de sulfato de amonio;
- 65 - 10 g/l de glicerol como única fuente de carbono.

El cultivo se realiza a 30 °C con agitación a 150 rpm en matraces con deflectores sellados con tapones porosos que permiten el suministro de oxígeno al medio. En estas condiciones, el cultivo dura aproximadamente de 24 a 48 horas.

2-b/ Selección de las cepas más eficaces:

5 Al final del 8º ciclo, las células se sembraron a razón de 2000 células por placa (150 mm de diámetro) de medio con gelosa (YPG + agar).

10 A continuación, las colonias obtenidas de este modo, se cultivaron en formato *Deep Well* (pocillos profundos) (= microplaca de 96 pocillos) en medio YPG.

Después de 72 horas de cultivo a 30 °C, las colonias se transfirieron al medio YFX50-Ac-5000, cuya composición se indica a continuación:

YFX50-Ac-5000	g/kg	ml/kg
Agua destilada csp	1000	
Xilosa	50	
EXL tipo J	5	
DAP	4,7	
Ácido cítrico	11,4	
Citrato trisódico	13,5	
Ácido acético	5	
pH 5		
ZnSO ₄ (10,6 g/l)		2
MgSO ₄ ·7H ₂ O (400 g/l)		2,5
Tiamina Vit B1 (18,24 g/l)		1
Piridoxina Vit B6 (5,28 g/l)		1
Biotina (1,76 g/l) + KOH		1
Pantotenato (3,8 g/l)		1
Ácido nicotínico (8 g/l)		2,5
Mesoinositol (50 g/l)		1
Riboflavina (1 g/l)		1
Para amino-benzoato (1,2 g/l)		1
Tween 80		1

15 En la práctica, se trata del mismo medio de cultivo que el primer medio de crecimiento utilizado en el procedimiento según la invención, con una concentración de ácido acético (cantidad introducida en el medio de cultivo a pH 5) igual a 5 g/l.

20 Del mismo modo, las condiciones de cultivo son similares:

Condiciones:

25 pH: 5
 Temperatura: 32 °C
 Condiciones de O₂: sin suministro de oxígeno (anaerobias)
 Agitación: 100 rpm
 Tiempo de cultivo: 72 horas
 Precultivo / Incubación:

- 30
- Recuperación de colonias para cultivos líquidos en Deep Well (microplacas de 96 pocillos);
 - 0,25 g/kg eq MS para cultivos líquidos.

2-c/ Validación de cepas aisladas:

35 Medio: YFP-5000

- 40
- 10 g/l de extracto de levadura;
 - 10 g/l de bacto-peptona;
 - 55 g/l de glucosa;
 - 45 g/l de xilosa;
 - 5 g/l de ácido acético (cantidad introducida en el medio de cultivo a pH 5);
 - KOH.

45

Condiciones:

pH: 5
Temperatura: 32 °C
Condiciones de O₂: sin suministro de oxígeno
5 Agitación: 100 rpm
Tiempo de cultivo: hasta 72 horas
Precultivo / Incubación: 0,25 g/kg eq MS de levaduras previamente propagadas en medio YPG.

3/ Evaluación de la pérdida de masa:

10 La producción de etanol se mide indirectamente midiendo la pérdida de masa del matraz de fermentación, estando esta pérdida de masa directamente correlacionada con la producción de alcohol. Se expresa en g por kg de medio.

4/ Evaluación de la velocidad de producción de CO₂:

15 A partir de la determinación de la pérdida de masa (correspondiente a la producción de CO₂), es posible determinar la velocidad de consumo de xilosa (expresada en g/l) que es el doble de la pérdida de masa.

20 La velocidad máxima de producción de CO₂ se expresa en g.kg⁻¹.h⁻¹.g⁻¹ de MS (materia seca).

II/ Resultados:

1/ Selección de cepas de interés:

1-a/ Evolución dirigida:

25 La evolución dirigida se realizó en modo SBR ("*Single Batch Repeat*"):

- 30 - Ciclos 1 a 3: medio 1 con 3 g/l de ácido acético (añadido al medio a pH 5) después medio 2 y después medio 3;
- Ciclos 4 a 6: medio 1 con 4 g/l de ácido acético después medio 2 y después medio 3;
- Ciclo 7: medio 1 con 5 g/l de ácido acético después medio 2 y después medio 3;
- Ciclo 8: medio 1 con 6 g/l de ácido acético después medio 2 y después medio 3.

1-b/ Selección de las cepas más eficaces:

35 Después del aislamiento de los clones en medio sólido y su precultivo en medio líquido, estos se siembran en microplacas de tipo *Deep Well* que contienen medio YFX50-Ac-5000 (50 g/kl de xilosa y 5 g/l de ácido acético a pH=5).

40 Después de 72 horas de fermentación en este medio, las cepas seleccionadas (16 en total) son las que muestran un mejor crecimiento, por análisis de la densidad celular del medio. Las cepas CNCM I-4071 y CNCM I-4829 sirvieron respectivamente como controles negativos y positivos con respecto a la capacidad de las células para utilizar xilosa para su crecimiento.

45 Estas 16 cepas fueron evaluadas desde un punto de vista cinético en este mismo medio. Los resultados se muestran en la figura 1, que representa la pérdida de masa en función del tiempo de fermentación. Como era de esperar, ya que este medio solo contiene xilosa (no glucosa), el perfil observado de todas las cepas analizadas es monofásico. En cambio, parece que la derivada en el origen de la curva varía en función de las cepas. Esto puede formularse utilizando la ecuación $ax + b$, siendo a variable según las cepas.

50 La figura 1 revela que la cepa E9 muestra los mejores rendimientos. Esta cepa se ha depositado en el Instituto Pasteur (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) con el número CNCM I-4953 el 29 de enero de 2015 y se utilizó en el resto de los experimentos.

2/ Propiedades de la cepa 1-4953:

2-1/ En medio xilosa:

60 La primera etapa consistió en determinar el impacto de la evolución dirigida sobre la capacidad de esta cepa para resistir al ácido acético durante la fermentación de la xilosa. Para ello, el análisis consistió en medir la velocidad máxima de producción de CO₂ durante la fermentación de xilosa en medio YFX50-Ac. Para obtener una curva de efecto/dosis, se añadieron diferentes concentraciones de ácido acético al medio de fermentación.

65 La figura 2 muestra que esta cepa tiene una velocidad máxima de consumo de xilosa, igual al doble de la pérdida de masa en fermentación, que es aproximadamente un 15 % superior al de la cepa I-4829 en ausencia de ácido acético. Esta diferencia es aún mayor cuando la dosis de ácido acético es de 4 g/l. En efecto, a esta concentración, la velocidad de consumo de xilosa se reduce en un 85 % para la cepa I-4829, en comparación con solo el 15 % para la cepa I-

4953. Esto significa que en presencia de ácido acético a 4 g/l y a pH 5, la cepa I-4953 tiene la misma velocidad de consumo de xilosa que la cepa I-4829 en ausencia de ácido acético.

2-2/ En medio glucosa + xilosa:

5 Para comprender mejor el impacto de la evolución dirigida sobre la fermentación en general, la pérdida de masa en función del tiempo de fermentación se controló en un medio que contenía glucosa, xilosa y ácido acético.

10 Los resultados se muestran en la figura 3, que ilustra claramente el doble efecto del ácido acético sobre las levaduras capaces de fermentar la xilosa:

- 15 - Durante la primera fase, denominada "fase de glucosa", la cepa I-4538 presenta un retraso en el inicio de la fermentación de aproximadamente 24 horas. En las otras cepas (I-4749, I-4829 e I-4953), el retraso es de solo 5 a 6 horas. Esta constatación significa que la cepa aislada no perdió resistencia con respecto al ácido acético durante la fermentación de la glucosa;
- Cuando la fermentación de la xilosa toma el relevo, las cinéticas de las cepas I-4538, I-4749 e I-4829 son comparables. En cambio, para la cepa I-4953, es notable que la producción de CO₂ (y en consecuencia la del etanol) es más rápida y mayor que la observada en las otras 3 cepas.

20 Estos resultados confirman la obtención de una cepa más resistente con respecto al ácido acético durante la fermentación de xilosa, y por tanto más eficiente globalmente.

III/ Conclusiones:

25 El procedimiento descrito ha permitido seleccionar al menos una cepa estable, I-4953, que ha conservado su capacidad de fermentar la glucosa con un retraso limitado en el inicio, mostrando al mismo tiempo una cinética de fermentación de xilosa mejorada en presencia de ácido acético.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de selección de una cepa de levadura que muestra una capacidad mejorada para fermentar una pentosa, ventajosamente xilosa, en presencia de ácido orgánico, ventajosamente de ácido acético, en forma no disociada,
- en el que al menos una cepa de levadura que muestra una capacidad para fermentar dicha pentosa, se cultiva sucesivamente en los 2 medios siguientes:
- 10 - un primer medio de crecimiento que comprende como única fuente de carbono dicha pentosa y dicho ácido orgánico en forma no disociada;
- un segundo medio de crecimiento que comprende como única fuente de carbono otra fuente de carbono, ventajosamente glucosa, y que carece de dicho ácido orgánico en forma no disociada,
- 15 repitiéndose al menos dos veces el cultivo sucesivo en al menos estos dos medios de crecimiento, en presencia de concentraciones crecientes de ácido orgánico en forma no disociada a una concentración comprendida entre 1,3 y 2,6 g/l.
- 20 2. Procedimiento de selección de una cepa de levadura según la reivindicación 1, *caracterizado* por que, en cada ciclo o al menos una vez en el procedimiento, después del cultivo en los dos primeros medios de crecimiento, se realiza un cultivo en aerobiosis en un medio mínimo que contiene una fuente de carbono estrictamente respiratoria como única fuente de carbono, ventajosamente glicerol.
- 25 3. Procedimiento de selección de una cepa de levadura según la reivindicación 1 o 2, *caracterizado* por que el cultivo de la cepa, sucesivamente en los dos o tres medios de crecimiento, se repite más de 2 veces pero menos de 10 veces, ventajosamente 8 veces.
- 30 4. Procedimiento de selección de una cepa de levadura según una de las reivindicaciones anteriores, *caracterizado* por que la cepa de levadura que muestra una capacidad para metabolizar dicha pentosa, se elige del siguiente grupo: I-4538, I-4749, I-4829 e I-4966, ventajosamente I-4829 y/o I-4966.
- 35 5. Cepa de levadura que puede obtenerse mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, depositada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) con el número I-4953 el 29 de enero de 2015.
6. Levadura obtenida mediante el cultivo de una cepa según la reivindicación 5.
- 40 7. Uso de una cepa según la reivindicación 5 o de una levadura según la reivindicación 6, para la fermentación de un material, que contiene ventajosamente xilosa, y/o para la producción de etanol.
- 45 8. Procedimiento de producción de productos de fermentación o de etanol, que comprende las siguientes etapas:
- Incubación de un material o medio que contiene xilosa con una cepa según la reivindicación 5 o una levadura según la reivindicación 6;
 - Fermentación en condiciones anaerobias o semi-anaerobias;
 - Recuperación del (de los) producto(s) de fermentación o del etanol.
- 50 9. Procedimiento de producción de productos de fermentación o de etanol según la reivindicación 8, *caracterizado* por que el material o medio también contiene glucosa.

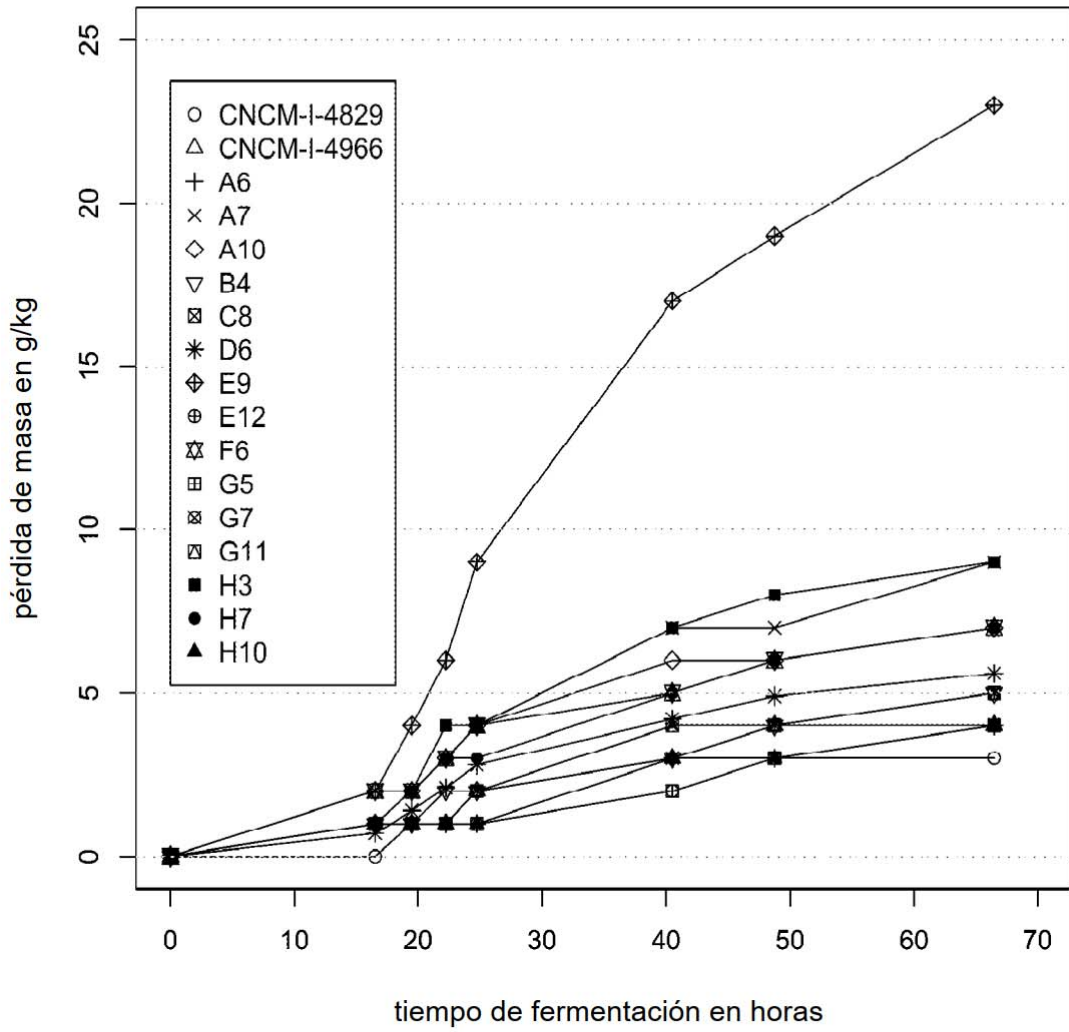


Figura 1

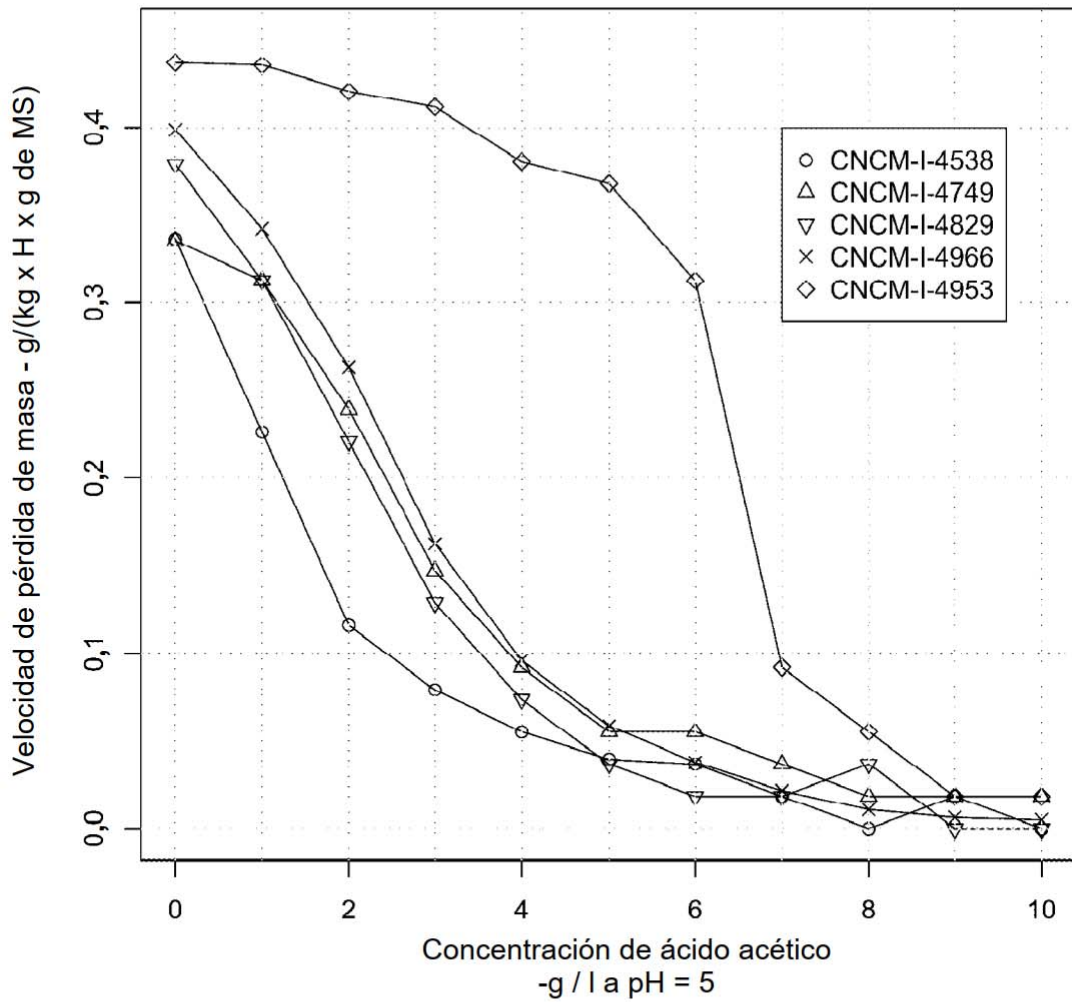


Figura 2

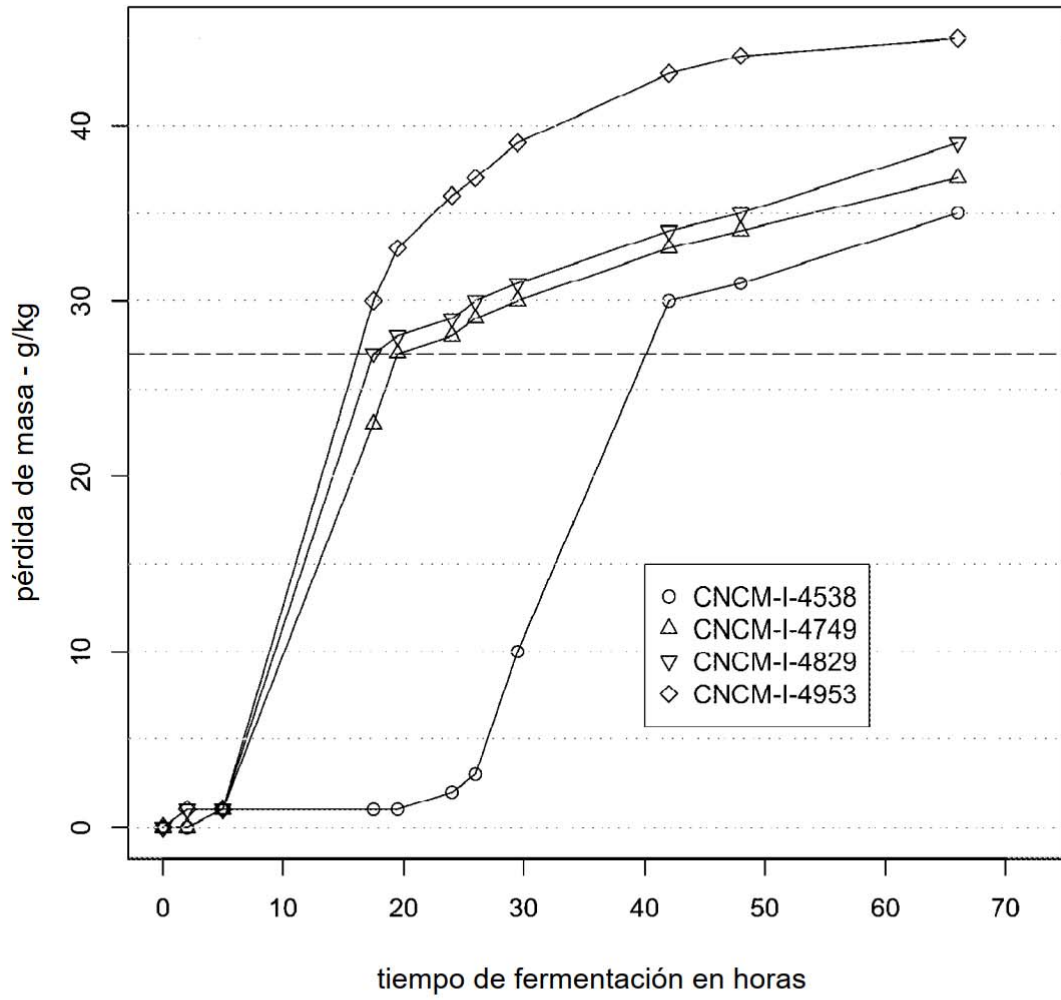


Figura 3